

REC'D 18 FEB 2003	
WIPO	PCT

PCT/KR 03/00131

RO/KR 21.01.2003



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2002-0011648
Application Number

출원 년 월 일 : 2002년 03월 05일
Date of Application MAR 05, 2002

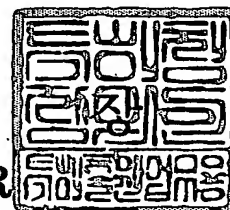
출원인 : 김범준
Applicant(s) KIM BUM JOON



2003 01 21
 년 월 일

특 허 청

COMMISSIONER



**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.03.05
【발명의 명칭】	미코박테리움속 균주의 h s p 65 유전자 분절 및 이를 이 용한 미코박테리움속 균주의 동정방법
【발명의 영문명칭】	HSP 65 GENE FRAGMENTS AND METHOD OF IDENTIFYING MYCOBACTERIAL SPECIES WITH THE SAME
【출원인】	
【성명】	김범준
【출원인코드】	4-2001-033138-7
【대리인】	
【명칭】	유미특허법인
【대리인코드】	9-2001-100003-6
【지정된변리사】	원영호
【포괄위임등록번호】	2001-048489-7
【발명자】	
【성명】	김범준
【출원인코드】	4-2001-033138-7
【발명자】	
【성명】	국윤호
【출원인코드】	4-1998-030545-3
【발명자】	
【성명의 국문표기】	변경희
【성명의 영문표기】	BYUN, KYUNG HEE
【주민등록번호】	760421-2932717
【우편번호】	690-022
【주소】	제주도 제주시 이도2동 고덕하이츠빌라 203호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이경갑
【성명의 영문표기】	LEE, KYOUNG KAP
【주민등록번호】	560529-1067012

【우편번호】 690-170
【주소】 제주도 제주시 연동 1399 연동대림아파트 104동 202호
【국적】 KR
【심사청구】 청구
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】
【서열개수】 56
【서열목록의 전자파일】 첨부
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대
 리인 유미특허법
 인 (인)
【수수료】
【기본출원료】 20 면 29,000 원
【가산출원료】 53 면 53,000 원
【우선권주장료】 0 건 0 원
【심사청구료】 5 항 269,000 원
【합계】 351,000 원
【감면사유】 개인 (70%감면)
【감면후 수수료】 105,300 원
【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 미코박테리움속 hsp 65 유전자의 604-bp 분절을 나타내는 폴리뉴클레오타이드, 및 이들을 이용한 미코박테리움속 균주를 동정하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 hsp 65 유전자의 604-bp 분절은 비교염기서열 분석방법, 프로브혼성화법, 및 PCR-RFLP등의 방법에 이용가능하고, hsp 65 유전자의 604-bp 분절을 이용한 동정법은 생장속도가 느리고 다양한 균주가 존재한다는 문제점, 그리고 물질위주 동정 및 16s rDNA 동정이 갖는 문제점을 해결하여, 간편하고, 경제적이고 정확성이 높은 동정방법을 제공한다는 장점이 있어, 향후 미코박테리움속 균주의 동정에 널리 이용될 수 있다.

【대표도】

도 1

【색인어】

미코박테리움속, heat shock protein 65, 604 bp 분절, 동정, 탐지

【명세서】**【발명의 명칭】**

미코박테리움속 균주의 h s p 65 유전자 분절 및 이를 이용한 미코박테리움속 균주의 동정방법{HSP. 65 GENE FRAGMENTS AND METHOD OF IDENTIFYING MYCOBATERIAL SPECIES WITH THE SAME}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명에 따른 hsp 65 유전자 분절 및 프라이머의 위치를 나타내는 모식도이다.

도 2는 미코박테리움속 표준균주의 hsp 65 유전자의 증폭산물을 분석한 결과를 나타내는 사진이다.

도 3은 본 발명에서 분석한 미코박테리움속 표준균주 50주의 계통도를 나타낸다.

도 4a 내지 4d는 본 발명에서 분석한 미코박테리아 임상 분리 균주의 hsp 65 유전자 분절(604-bp)의 비교 염기서열 분석방법에 의한 동정결과를 나타낸다.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

<5> 본 발명은 미코박테리움속 균주의 hsp 65 (Heat Shock Protein 65) 유전자 분절, 및 이를 이용한 미코박테리움속 균주의 동정방법에 관한 것이다.

<6> 미코박테리움(Mycobacterium)속(屬)에는 결핵, 우형결핵(牛形結核), 나병(癩病)과 같이 사람과 동물에 심각한 질병을 일으키는 균주(species)뿐 아니라, 기회감염균으로

일컬어지는 균주, 그리고 자연환경에서 볼 수 있는 사물(死物)기생 균주(saprophytic species) 등 현재까지 약 72종(species)이 알려져 있으며, 그 중 인체질환과 관련된 것이 25여종에 이르는 것으로 알려져 있다.

<7> 미코박테리아 감염증 가운데 가장 많은 질병은 결핵(Tuberculosis)으로, 강한 병원성을 갖는 결핵균군(群)(M.tuberculosis complex: TB complex)으로 구분되는 M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum, M. microti의 4종이 원인균이며, 이 중 결핵균(M. tuberculosis)이 가장 흔하고 중요한 원인균으로 알려져 있다. 결핵은 항 결핵제의 효율적인 사용으로 1980년대 말까지는 계속 감소하는 추세였으나, 1990년대에 내성결핵균의 증가와 후천성면역결핍증 환자의 증가 등으로 선진국에서는 점차 증가세에 있다. 특히 국내는 IMF 구제금융시기에 노숙자의 증가 등으로 현재 결핵으로 인한 사망이 감염 질환 중에서 가장 높고 연 3000명 이상이 결핵으로 인해 사망한다고 보고되고 있다.

<8> 비결핵항산성균 (Mycobacteria Other than Mycobacterium tuberculosis, MOTT 또는 nontuberculous mycobacteria, NTM)은 임상적으로 대부분 면역저하 환자나 노약자에서 질병을 일으키고 임상소견은 결핵과 유사하다. 비록 국내에는 상대적으로 결핵에 비해 발생율이 현저하게 낮지만 생활환경에 널리 분포하고 있어서, 임상가검물로부터 분리되어도 병원성 여부를 판단하기 힘들어 진단이 쉽지 않고, 또한 대부분의 항 결핵제에 약제 내성을 보여 치료가 어려우며, 재발율도 높은 것으로 알려져 있다. 또한 이러한 비결핵항산성균은 면역 기능의 저하가 없는 환

자에게도 질병을 일으키는 사실이 보고되었다. 지난 10년간 미국에서 발생한 미코박테리아증의 발생 빈도를 보면 결핵이 전체의 50% 정도를 차지하고 비결핵항산성균증이 나머지 50%를 차지하고 있다. 1980년 이후에 HIV(Human immunodeficiency virus) 감염이 확산되면서, 비결핵항산성균이 면역저하 환자에서 전신적인 파종성 감염을 일으킨다는 것이 알려져 비결핵항산성균에 대한 관심이 높아지고 있다.

<9> 미코박테리움속 균주는 각 종에 따라 항결핵제 내성 패턴이 서로 다르기 때문에, 약제 및 치료 방법이 서로 다른 경우가 많다(Wolinsky E: Mycobacterial diseases other than tuberculosis. *Clin Infect Dis* 15: 1-10, 1992). 따라서, 미코박테리움 속 균주를 종수준별로 감별 및 동정하는 것이 필요하다.

<10> 미코박테리움속 균주를 탐지 또는 동정하기 위한 방법중 하나인 생화학적 동정 방법은 미코박테리움속 균주의 발육 속도가 느리기 때문에 시간이 오래 걸리고 숙련된 사람이 필요하다는 단점이 있다. 고성능액체크로마토그래피(High-performance lipid chromatography(HPLC)) 및 박층액체크로마토그래피(Thin layer lipid chromatography(TLC))를 이용한 세포벽의 지질 분석에 의한 동정방법은 역시 수행하기 까다롭고 비용이 많이 드는 단점이 있어 소수의 실험실에서만 이용하고 있다. 기존의 미코박테리움속 균주 동정 방법은 이들 균의 발육속도가 느리다는 생물학적인 특성 때문에 진단 및 동정하는 데에 있어서 시간이 많이 소요되므로(완속발육균의 경우 약 2-3개월 소요), 결국 임상적으로 치료시기를 놓칠 수 있는 문제점이 있다(Nolte FS, Metchock B: *Mycobacterium*, In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (ed.), *Manual of clinical microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 400-437, 1995.).

<11> 미코박테리움속 균주 동정을 위한 분자생물학적인 방법의 개발에 있어서 주요 표적으로 가장 널리 사용되고 있는 시계분자는 16S rDNA이다. 1990년도에 미코박테리움속 표준 균주의 16S rDNA의 염기서열이 결정되고 이들이 미코박테리움속 균주 간의 계통학적 관계를 잘 나타낸다는 보고 이후에, 현재까지 이를 이용한 여러 가지 동정 방법 (비교염기서열 분석방법, 프로브혼성화법, PCR-RFLP)이 개발되고, 이들 방법을 이용한 연구가 많이 이루어져 있다. 그러나 16S rRNA를 시계분자로 방법은 명백한 병원성균인 미코박테리움 칸사시(*M. kansasii*)와 비병원성 균인 미코박테리움 가스트리(*M. gastri*)와의 염기서열이 100% 일치하기 때문에 이 두종을 감별하지 못하며, 또한 신속발육 미코박테리아나 미코박테리움 테라 복합체(*M. terrae* complex)와 같은 균은 한 개체에 16S rDNA를 코딩하는 여러 유전자가 존재하고 이들의 염기서열이 서로 다르기 때문에 직접염기서열 분석 방법에 의해 염기서열을 결정하지 못하고 이들 유전자를 vector에 클로닝 한 후 분석해야 하기 때문에 시간과 비용면에서 효율적이지 못하다는 단점이 있다.

<12> 16S rDNA 이외에 대체 시계분자로서 *dnaJ* 분자와 23S rDNA를 이용한 방법 등이 1994년에 발표되었지만, 이들은 각각 균주간의 계통학적 관계를 나타내는 데에 있어서의 문제점, 염기서열의 보존성 등의 문제점 등 때문에 현재 거의 진단표적으로서 이용되지 않고 있다(Victor TC, Jordaan AM, Van Schalkwyk EJ, Coetzee GJ, Van Helden PD. Strain-specific variation in the *dnaJ* gene of mycobacteria. J Med Microbiol. 44(5):332-339, 1996). 또한 1993년에 Telenti A 등에 의해서 *hsp 65* 유전자 분절을 표적으로 하는 폴리머라제 사슬 반응 및 제한효소절단 (Polymerase Chain Reaction-Restriction Enzyme Length Polymorphism, PCR-RFLP)에 의한 균 동정방법이 개발되어 널리 이용되고 있으나, 염기서열 분석은 신속발육균의 몇 개의 종에 대해서만 분

석되었고, 따라서 DNA 칩이나, 프로브-혼성화용으로는 진단방법이 개발되지 않은 상태이다(Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol. 31(2):175-8. 1993). 국내에서는 미코박테리움 속 균주 동정을 주로 기존의 생화학적인 동정 방법에 의존하고 있다. 따라서, 동정까지의 시간이 오래 걸리기 때문에 치료시기를 놓칠 수 있는 문제점이 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<13> 상기와 같은 문제점을 해결하고자, 본 발명은 미코박테리움속 균주의 hsp 65 분절을 제공하는 것이다.

<14> 본 발명은 미코박테리움속 표준균주의 hsp 65 유전자 분절을 1종 이상 포함하는, 미코박테리움속 균주의 탐지 또는 동정을 위한 뉴클레오타이드 세트를 제공하고자 한다.

<15> 본 발명의 또다른 목적은 상기 hsp 65의 분절을 이용하여 미코박테리움속 균주의 탐지 또는 동정하는 방법을 제공하고자 한다.

【발명의 구성 및 작용】

<16> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

<17> SEQ ID NO: 1 내지 SEQ ID NO: 54에 나타난 염기서열로 이루어진 군에서 선택되며, 미코박테리움속 균주의 hsp 65의 604-bp 분절을 나타내는 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다.

- <18> 본 발명은 SEQ ID NO: 1 내지 SEQ ID NO: 54에 나타난 염기서열로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 미코박테리움 균주의 hsp 65의 604-bp 분절을 포함하는, 미코박테리움속 균주의 탐지 또는 동정을 위한 뉴클레오타이드 세트에 관한 것이다.
- <19> 또한, 본 발명은
- <20> (1) 미코박테리움속 균주의 hsp 65의 604-bp 분절을 특이적으로 증폭시키는 프라이머를 이용하여, 목적 균주의 hsp 65 유전자 분절을 증폭하고,
- <21> (2) 상기 증폭된 hsp 65 유전자 분절의 염기서열을 분석하고,
- <22> (3) 단계 (2)에서 얻어진 염기서열과 표준균주의 hsp 65 유전자 604-bp 분절의 염기서열을 비교하는 단계를 포함하는, hsp 65 유전자 분절을 이용한 미코박테리움속 균주의 탐지 또는 동정방법에 관한 것이다.
- <23> 미코박테리움속 균주의 동정 및 분류방법상의 문제점을 감안하여, 본 발명자들은 모든 미코박테리움속 균주의 PCR 증폭에 사용되는 프라이머쌍을 이용하여, 표준균주를 대상으로 새로운 시계분자인 hsp 65 유전자 604-bp 분절의 염기서열을 분석하여 데이터 베이스를 구축하였다. 또한, 목적 균주의 hsp 65 유전자 분절을 증폭하여, 상기 데이터 베이스와 비교 분석함으로써 새로운 미코박테리움속 균주의 탐지 또는 동정방법을 개발하게 되었다.
- <24> 이하에서 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- <25> 본 발명은 미코박테리움속 균주를 탐지 또는 동정하기 위한 hsp 65 유전자 분절을 나타내는 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다.

- <26> 본 발명에서 미코박테리움속 균주의 동정을 위한 시계분자로서 결핵균의 1623-bp 전체 유전자 중에서 163번째 염기서열부터 806-bp번째의 염기서열 총 644-bp의 염기서열을 사용하였으며, 프라이머 40-bp을 제외하면 604-bp서열이며, 이는 기존에 Telenti 등이 이용한 439bp의 유전자 분절과는 다른 부위의 분절이다(도 1). 바람직하게는, 본 발명은 SEQ ID NO:1 내지 SEQ ID NO:54에 기재된 염기서열을 폴리뉴클레오타이드이다. 54주의 미코박테리움속 표준균주의 hsp 65 604-bp 유전자 분절의 염기서열은 Genbank 검색상에서 모두 새로운 염기서열로 밝혀졌다.
- <27> 본 발명에 따른 폴리뉴클레오타이드를 이용하여 여러 가지 동정 방법, 예컨대 비교 염기서열 분석방법, 프로브 혼성화법 및 PCR-RFLP에 따라 미코박테리움속 균주를 동정할 수 있다. 상기 비교염기서열 분석방법, 프로브혼성화법 및 PCR-RFLP방법은 본 기술분야에 속하는 전문가에게 알려진 방법에 따라 실시할 수 있으며, 예컨대 시계분자로서 16s rRNA를 사용하여 분석하는 방법을 모두 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 이용하는 방법에 적용가능하다.
- <28> 본 발명에서 미코박테리움속 균주의 hsp 65 유전자를 증폭하기 위한 바람직한 프라이머쌍을 얻기 위해서, 본 발명자들은 미코박테리움 속 균주중에서 전체 1623 bp의 hsp 65 유전자의 염기서열이 분석된 *M. tuberculosis* (GenBank No. M15467) 및 *M. avium* (GenBank No. AF281650) 2주와 이들과 계통학적으로 가장 유사한 *Tsukamurella* 속 균주인 *T. paurometabola* (GenBank No. AF352578) 1 주를 포함하여 총 3주의 염기서열을 분석하여 모든 미코박테리움 속 균주를 증폭시킬 수 있는 프라이머쌍을 제조한다. 각각 결핵균의 hsp 65 염기서열 중에서 163번째부터 182번째까지의 총 20개의 염기로 구성된 정방향 프라이머와 787번째 염기서열부터 806 번째 염기로 구성되는 총 20개의 염기로 구

성된 역방향 프라이머를 사용할 수 있다. 또한, 미코박테리움속 균주의 hsp 65 유전자의 664bp 유전자 분절을 증폭하기 위해서 상기 프라이머쌍을 다소 변경하거나 상기 프라이머 서열을 포함하는 서열을 프라이머 서열도 또한 본 발명에 사용할 수 있음은 본 발명이 속하는 분야의 통상의 지식을 가진 기술자에게 자명할 것이다. 상기 프라이머쌍 부위는 미코박테리움 속 균주에 속하는 *M. tuberculosis*와 *M. avium*와 100% 염기서열 상동성을 보일 뿐만 아니라 다른 속 균주인 *Tsukamurella paurometabola* 와도 100% 상동성을 보이는 계통학적으로 보존된 부위를 사용하였다. 바람직하게는, 정방향 프라이머 서열은 5' -ATGCCAAGGAGATCGAGCT-3' 이고 이를 SEQ ID NO: 55에 나타냈으며 HSPF3로 명명하였다. 또한, 역방향 프라이머 서열은 5' -AAGGTGCCGCGGATCTTGTT-3' 이고 이를 SEQ ID NO: 56에 나타냈으며 HSPR4로 명명하였다. 본 발명에 사용된 시계분자인 hsp 65 분절과 프라이머위치를 도 1에 개략적으로 표시하고 있다.

<29> 미코박테리움속 균주의 탐지 또는 동정을 위한 데이터베이스 구축을 위해서, 하기 표 1에 나타난 균주들을 표준균주로 선정하였다. American Type Culture Collection(ATCC)에서 분양받은 47주의 미코박테리움 속 표준균주, 대한민국, 서울에 소재한 가톨릭의과대학의 나병연구소로부터 분양받은 *M. leprae*의 표준균주 (Thai 53 strains)의 DNA, 및 V Vincent로부터 분양받은 2 개의 *M. kansasii* 표준균주 (type II, III)를 포함하여 DNA 총 50주의 미코박테리움속 표준 균주를 대상으로 hsp 65 유전자 분절의 염기서열을 분석하였다. 또한 미코박테리움속 균주와 계통분류학적으로 가장 유사한 츠카무렐라(*Tsukamurella*) 3주를 German Collection of Microorganisms and Cell Cultures로부터 분양받고 또한 노카르디아(*Nocardia*) 1 주를 ATCC로부터 분양받아 hsp 65 유전자 분절의 염기서열을 분석하였다(표 1).

<30> 【표 1】

본 발명의 표준균주

미코박테리움속 표준균주					
No	종명	균주	No	종명	균주
1	<i>M. abscessus</i>	CAP97E-03	26	<i>M. kansasii</i> Type III	V. Vincent
2	<i>M. africanum</i>	ATCC 25420	27	<i>M. leprae</i>	Thai 53
3	<i>M. asiaticum</i>	ATCC 25276	28	<i>M. malmoense</i>	ATCC 29571
4	<i>M. aichiense</i>	ATCC 27280	29	<i>M. marinum</i>	ATCC 927
5	<i>M. avium</i>	ATCC 25291	30	<i>M. mucogenicum</i>	ATCC 49650
6	<i>M. bovis</i>	ATCC 19210	31	<i>M. neoaurum</i>	ATCC 25795
7	<i>M. bovis BCG</i>	French strain	32	<i>M. nonchromogenicum</i>	ATCC 19530
8	<i>M. celatum</i> Type I	ATCC 51131	33	<i>M. paratuberculosis</i>	ATCC 19698
9	<i>M. celatum</i> Type II	ATCC 51130	34	<i>M. phlei</i>	ATCC 11758
10	<i>M. chelonae</i>	ATCC 35749	35	<i>M. peregrinum</i>	ATCC 14467
11	<i>M. chitae</i>	ATCC 19627	36	<i>M. scrofulaceum</i>	ATCC 19981
12	<i>M. microti</i>	ATCC 19422	37	<i>M. senegalense</i>	ATCC 35796
13	<i>M. flavescens</i>	ATCC 14474	38	<i>M. shimoidei</i>	ATCC 27962
14	<i>M. fortuitum</i> 6841	ATCC 6841	39	<i>M. simiae</i>	ATCC 25275
15	<i>M. fortuitum</i> 49403	ATCC 49403	40	<i>M. smegmatis</i>	ATCC 19420
16	<i>M. fortuitum</i> 49404	ATCC 49404	41	<i>M. szulgai</i>	ATCC 35799
17	<i>M. gastri</i>	ATCC 15754	42	<i>M. terrae</i>	ATCC 15755
18	<i>M. genavense</i>	ATCC 51233	43	<i>M. thermoresitibile</i>	ATCC 19527
19	<i>M. gordonae</i>	ATCC 14470	44	<i>M. triviale</i>	ATCC 23292
20	<i>M. haemophilum</i>	ATCC 29548	45	<i>M. tuberculosis</i>	ATCC 27294
21	<i>M. interjectum</i>	ATCC 51457	46	<i>M. ulcerans</i>	ATCC 19423
22	<i>M. intermedium</i>	ATCC 51848	47	<i>M. vaccae</i>	ATCC 15483
23	<i>M. intracellulare</i>	ATCC 13950	48	<i>M. wolinskyi</i>	ATCC 700010
24	<i>M. kansasii</i> Type I	ATCC 12478	49	<i>M. parafortuitum</i>	ATCC 19686
25	<i>M. kansasii</i> Type II	V. Vincent	50	<i>M. farcinogenes</i>	ATCC 35753
미코박테리움속 외 표준균주					
1	<i>T. paurometabola</i>	DSM 20162	2	<i>T. tyrosinosolvens</i>	DSM 44234
3	<i>T. pulmonis</i>	DSM 44142	4	<i>N. carnea</i>	ATCC 6847

<31> 어떤 부위가 동정 및 진단의 표적으로 적합하기 위해서는 이 부위가 세균사이의 계통적 관계를 잘 나타내는 시계분자 인지를 살펴보아야 한다. 어떤 유전자가 세균의 계통적 관계를 잘 반영하는 시계분자가 되기 위해서는 일정한 요건을 만족해야 한다. 첫째로, 표적 유전자가 모든 세균에서 기능적으로 필수적이고 보존되어야 한다. 둘째로, 표적 유전자의 유전자 변이가 진화를 반영하는 시간적 요소에 의해서만 일어나야 한다. 즉, 균주간 선택압(selection pressure)에 의한 lateral transfer에 의한 염기서열 변이가 일어나지 않는다. 셋째로, 표적유전자는 균의 계통적 관계를 나타내기에 적절한 속

간 다양성(interspecies variation)과 같은 속내의 균주 사이의 보존성(intraspecies conservation)을 보여야 한다. 본 발명의 hsp 65 유전자의 604-bp 분절은 이러한 시계 분자의 조건에 적합함을 알 수 있다.

<32> 미코박테리움속 표준균주 50 주를 포함한 총 54 주의 표준균주의 염기서열을 직접 염기서열 분석 방법으로 분석한 후 얻어진 결과를 다정렬 (multialignment)하여 서로의 염기서열을 비교해 본 결과, 54 주 표준균주는 결핵균군속 균주 5주 즉 미코박테리움 아프리카눔(*M. africanum*), 미코박테리움 보비스(*M. bovis*), 미코박테리움 보비스 BCG(*M. bovis BCG*), 미코박테리움 마이크로티(*M. microti*), 미코박테리움 투베르쿨로시스(*M. tuberculosis*)를 제외한 나머지 균주들은 모두 다른 염기서열을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 각 종간 염기서열 다양성 (interspecies variation)을 보여준다. 염기서열이 같은 것으로 분석된 결핵균군 5 주는 16S rDNA나 혹은 *rpoB* 유전자 분절을 비롯한 다른 염기서열 분석방법으로도 모두 같은 염기서열을 보인다고 알려져 있기 때문에 이들은 서로 동일한 종(species)이라고 보고되고 있다. 시계분자는 먼저 각 균주 간의 염기서열 다양성이 선행되어야 하는 데 본 실험에서 그 조건을 충족시킴을 확인할 수 있었다. 둘째, 54 주의 염기서열 모두 다정렬상에서 염기서열 삽입(insertion)이나, 결실(deletion)없이 모두 604-bp의 염기를 코딩하고 있었다. 즉, 다정렬 상에서 어떠한 갭(gap)도 존재하지 않는다는 사실이다. 16S rDNA는 정렬상에서 높은 빈도로 갭이 존재한다. 다정렬할 때 일반적으로 갭은 그 부위에 해당되는 정렬된 유전자를 전부 제거하여 분석하는 경향이 있기 때문에 전체적인 계통수를 구축하는 데에 오류를 일으킬 확률이 높다고 알려져 있다. 따라서 본 발명에서 사용된 hsp 65 유전자의 염기서열을 이용한 균주 동정 방법의 우수성을 다시 한 번 확인할 수 있다.

- <33> 따라서 본 발명의 hsp 65 604-bp 영역이 시계분자로서 적절한지를 알아보기 위해서, 여러 가지 미코박테리움속 균주의 hsp 65 604-bp 분질의 염기서열을 취하여 계통도를 작성한다. 또한, 상기 염기서열을 이용하여 이미 다른 방법으로 동정된 미코박테리움속 균주를 정확히 구분됨을 확인할 수 있다.
- <34> 본 발명에서 분석된 미코박테리움속 표준균주의 계통수는 미코박테리아의 자연적인 특성을 잘 반영하는 계통수이다. 즉 미코박테리움속 표준균주 50 주가 *T. paurometabola*을 outgroup으로 할 때 하나의 큰 그룹을 형성함을 확인할 수 있었다(도 3). 또한 완속발육균과 신속발육균이 서로 완전히 다른 그룹을 형성하고 있음을 확인하였고, 명백한 절대병원성균인 *M. tuberculosis*와 *M. leprae*가 서로 같은 분절을 형성하고, 또한 비결핵항산성균주 중에서 가장 빈번히 분리되고, 또한 생화학적인 특성이 거의 비슷한 *M. avium*과 *M. intracellulare*가 서로 같은 분절을 형성하는 등 미코박테리아의 일반적인 특성을 잘 반영하고 있음을 확인하였다. 또한 본 계통수의 가장 큰 특성은 16S rDNA 분석방법으로는 100% 염기서열 상동성을 보이기 때문에 감별이 불가능한 *M. kansasii*와 *M. gastri* 와의 구별뿐만 아니라, *M. kansasii* 사이에서의 아종(subspecies)까지의 구별도 가능함을 확인하였다(즉, *M. kansasii* Type I, II, III의 염기서열이 서로 차이를 보이고 있다). 완속발육균과 신속발육균이 서로 다른 그룹으로 분지되고 결핵균과 나병균 같은 절대병원성균이 서로 같은 그룹으로 분지되는 등 미코박테리움속 균주의 계통학적인 관계를 잘 반영하고 있다.
- <35> 또한, 본 발명은 미코박테리움속 균주의 hsp 65 604-bp 분질을 이용하여 미코박테리움속 균주를 동정하는 방법을 제공한다.
- <36> 더욱 자세하게는, 본 발명은

- <37> (1) 미코박테리움속 균주의 hsp 65의 604-bp 분절을 특이적으로 증폭시키는 프라이머를 이용하여, 목적 균주의 hsp 65 유전자 분절을 증폭하고,
- <38> (2) 상기 증폭된 hsp 65 유전자 분절의 염기서열을 분석하고,
- <39> (3) 단계 (2)에서 얻어진 염기서열과 표준균주의 hsp 65 604-bp 분절의 염기서열을 비교하는 단계를 포함하는, hsp 65 유전자 분절을 이용한 미코박테리움속 균주의 탐지 또는 동정방법에 관한 것이다.
- <40> 바람직하게는, 상기 단계 (3)에서 목적균주의 hsp 65 604-bp 분절의 염기서열과, 상기 미코박테리움 표준균주의 hsp 65 604-bp 폴리뉴클레오타이드 세트의 염기서열에 대입하여 다정렬(multialignment)한 후에 계통도를 완성하여 미코박테리움속 균주를 탐지 또는 동정할 수 있다.
- <41> 비교염기서열 분석방법에 따르면, 본 발명은 모든 미코박테리움속 균주의 hsp 65 증폭용 프라이머, 바람직하게는 SEQ ID NO: 55 및 SEQ ID NO: 56에 나타난 염기서열을 갖는 프라이머쌍을 이용하여 미코박테리움속 표준균주의 hsp 65 분절을 증폭하고, 증폭된 644-bp 분절의 염기서열을 분석하여 데이터베이스를 구축한다. 프라이머 부위를 제외한 54종 표준균주의 hsp 65 604-bp 분절의 염기서열을 분석한 후 다정렬(multi-alignment)하여 얻어진 염기서열을 데이터베이스화한다. 본 발명에서 사용한 표준균주의 hsp 65 유전자의 604-bp 분절의 염기서열을 SEQ ID NO:1 내지 SEQ ID NO:54에 나타냈다. 이렇게 구축된 데이터베이스를 이용하여 표준 균주 이외의 임상분리 균주를 대상으로 하여 비교염기서열 분석을 수행하여 동정을 실시한다.

<42> 또한, 본 발명에서 목적 균주의 hsp 65 유전자 분절의 염기서열과 표준균주의 hsp 65 유전자 분절의 염기서열의 상동성을 기준으로 결정할 수 있다. 다만, 각 균주의 상동성의 범위가 서로 상이하기 때문에 각 균주에 특이적인 상동성 범위를 기준으로 동정에 사용할 수 있으며, 예컨대, *M. gordonae*인 경우에는 상동성 범위가 넓고 *M. tuberculosis*인 경우에는 범위가 좁다. 본 발명에서 목적균주의 hsp 65 604-bp 유전자 분절의 염기서열을 표준균주의 hsp 604-bp 유전자 분절의 염기서열에 대입하여 다정렬 후 계통도를 완성하여 결정할 수 있다.

<43> 본 발명에서 구축된 50 주의 미코박테리움 속 표준 균주의 604-bp *hsp 65* 유전자 분절의 염기서열 데이터베이스가 실제로 임상분리 균주 동정에 적용될 수 있는지를 알아보기 위하여 결핵연구원에서 생화학적인 방법, 예컨대 고체배지에서 색소형성, 최적 성장 온도, 카탈라제(catalase), 철 섭취(iron uptake), p-니트로벤조산(p-nitrobenzoic acid)를 첨가한 배지에서 성장 정도, 트윈 80 가수분해 시험, 텔루이트(Tellulite) 환원 시험, 5% NaCl에서의 성장 정도, 니아신(Niacin) 생산, 니트레이트(Nitrate) 환원 시험, 유레이즈(Urease) 생산 시험 등을 수행하여 동정이 완료된 38 주의 미코박테리움 속 임상 분리 균주를 대상으로 선택하여 다음 표2에 나타냈으며, 이들 38주를 대상으로 맹검 시험법(blind test)을 수행하였다. 임상분리 미코박테리아는 결핵균 10주와 비결핵항산성균 28 주를 포함하여 총 38 주의 균주를 대상으로 비교염기서열 분석방법을 수행하여 균 동정에 이용하였다(표2). 하기 표2에서 균주항목에 표시된 번호는 결핵연구원에서 임의로 부여한 번호이다. 또한, 생화학검사결과는 결핵연구원에서 수행한 생화학적 동정법에 의한 균동정 결과이고, hsp 65 유전자 분석결과는 본 발명의 방법으로 동정한 균동정 결과를 나타낸다.

<44> 【표 2】

본 발명의 임상 분리 균주

No.	균주	생화학 검사 결과	hsp 65 유전자 분석 결과
1	KIT 77009	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>
2	KIT 77710	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>
3	KIT 77712	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>
4	KIT 77714	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>
5	KIT 77719	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>
6	KIT 77720	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>
7	KIT 77721	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>
8	KIT 77722	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>
9	KIT 77723	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>
10	KIT 77725	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>
11	KIT 41105	<i>M. avium</i> complex	<i>M. intracellulare</i>
12	KIT 41110	<i>M. avium</i> complex	<i>M. avium</i>
13	KIT 41111	<i>M. avium</i> complex	<i>M. intracellulare</i>
14	KIT 41115	<i>M. avium</i> complex	<i>M. intracellulare</i>
15	KIT 30101	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. scrofulaceum</i>
16	KIT 30102	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. scrofulaceum</i>
17	KIT 20118	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i> Type I
18	KIT 20119	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i> Type I
19	KIT 20120	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i> Type I
20	KIT 47101	<i>M. terrae</i> complex	<i>M. nonchromogenicum</i>
21	KIT 47102	<i>M. terrae</i> complex	<i>M. nonchromogenicum</i>
22	KIT 47103	<i>M. terrae</i> complex	<i>M. nonchromogenicum</i>
23	KIT 47104	<i>M. terrae</i> complex	<i>M. nonchromogenicum</i>
24	KIT 32101	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>
25	KIT 32104	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>
26	KIT 32105	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>
27	KIT 32106	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>
28	KIT 31102	<i>M. szulgai</i>	<i>M. szulgai</i>
29	KIT 31103	<i>M. szulgai</i>	<i>M. szulgai</i>
30	KIT 31106	<i>M. szulgai</i>	<i>M. szulgai</i>
31	KIT 31107	<i>M. szulgai</i>	<i>M. szulgai</i>
32	KIT 21101	<i>M. marinum</i>	<i>M. marinum</i>
33	KIT 60108	<i>M. fortuitum</i> complex	<i>M. fortuitum</i> 6841
34	KIT 60109	<i>M. fortuitum</i> complex	<i>M. fortuitum</i> 6841
35	KIT 60110	<i>M. fortuitum</i> complex	<i>M. fortuitum</i> 6841
36	KIT 60111	<i>M. fortuitum</i> complex	<i>M. fortuitum</i> 6841
37	KIT 61104	<i>M. chelonae</i> complex	<i>M. abscessus</i>
38	KIT 61105	<i>M. chelonae</i> complex	<i>M. abscessus</i>

<45> 각 임상 분리균주의 DNA의 염기서열을 분석한 후 데이터베이스에 대입하여 다정렬 후 계통수를 완성하여 보았다. 그 결과 38 주의 균주를 모두 100% 민감도와 특이도로

중수준으로 동정할 수 있음을 확인하였다(표2 및 도4). 이하에서 그 결과를 상세히 설명하고자 한다.

<46> A. 미코박테리움 투베르쿨로시스(*M. tuberculosis*) 검체의 동정

<47> 미코박테리움속 균주 중에서 가장 병원성이 높고 보건 역학적으로 가장 중요한 균인 결핵균을 본 발명에서 구축된 미코박테리움속 표준균주 데이터베이스로 동정해 본 결과 20주 모두 결핵균으로 동정됨을 확인할 수 있었다(표 2, 도 4c). 이들 임상분리 결핵균 20 주의 hsp 65 유전자의 605-bp 염기서열은 표준 균주인 *M. tuberculosis* ATCC 27284의 hsp 65 유전자의 605-bp 염기서열은 100% 염기서열 상동성을 보임을 확인할 수 있었다. 시계분자로 기존에 가장 널리 사용되는 16S rDNA는 항결핵제 중의 하나인 스트렙토마이신의 내성과 관련되어 있고, 또한 *rpoB* 유전자는 항결핵제인 리팜핀에 대한 내성과 연관되어 있다. 따라서 이들 항결핵제에 내성을 획득한 결핵균은 이들 표적에 돌연변이를 일으킬 수 있지만 본 발명의 표적으로 사용한 hsp 65 유전자에는 다른 표적 유전자와 달리 항결핵제의 내성과 관련이 있는 유전자가 아니며, 이 유전자에서는 이러한 돌연변이가 일어나지 않는다. 따라서, 이러한 항결핵제에 대한 선택압에 대해 본 발명에 따른 hsp 65 604-bp 분절이 훨씬 안정적이라 할 수 있다.

<48> B. 미코박테리움 아비움 복합체(*M. avium* complex)의 임상 분리 균주의 동정

<49> 비결핵항산성 균주중에서 가장 빈번하게 분리되어지는 미코박테리움 아비움 복합체 임상 분리 균주를 4 주를 대상으로 균 동정을 수행해 본 결과 이들 중 3주는 미코박테리움 인트라셀룰라레(*M. intracellulare*)이고, 1 주는 미코박테리움 아비움으로 동정할 수 있었다. 생화학적인 방법으로는 이들 두 균주의 생화학적인 특성이 서로 같기 때문

에 미코박테리움 아비움 복합체에 속하는 미코박테리움 인트라셀룰라레와 미코박테리움 아비움을 서로 구별하여 동정하지 못하지만, 본발명에 따른 방법은 이들 균주를 모두 중 수준으로 감별할 수 있다. 본 발명의 방법에 의해 미코박테리움 아비움으로 동정된 1 주(KIT 41110)는 표준 균주인 *M. avium* ATCC 25281과 염기서열을 비교하여 보았을 때 전체 604-bp 중에서 3 개의 염기에서 다른 즉 99.5% 염기서열 상동성을 보임을 확인할 수 있었다. *M. intracellulare*로 동정된 3주(KIT 41105, 41111, 41115)와 표준균주인 ATCC 13850 4주의 염기서열의 상동성을 비교하여 보았을 때 서로 99.0 ~ 99.8%의 염기서열 상동성을 보임을 확인할 수 있었다. 이러한 사실은 *M. avium* complex 균주 중에서 *M. avium*에 비해 *M. intracellulare*가 서로 다른 여러 개의 유전형으로 이루어진다는 사실, 즉 *M. intracellulare*의 균주간에는 생물학적 이질성(heterogeneity)이 존재한다는 기존의 보고와 일치한다(Devallois A, Picardeau M, Paramasivan CN, Vincent V, Rastogi N: Molecular characterization of *Mycobacterium avium* complex isolates giving discordant results in AccuProbe tests by PCR-restriction enzyme analysis, 16s rRNA sequencing, and DT1-DT6 PCR. *J Clin Microbiol* 1997 35: 2767-2772).

<50> C. 미코박테리움 스크로ful라세움(*M. scrofulaceum*) 임상분리 균주의 동정

<51> 본 발명에 의한 방법에 의해 *M. scrofulaceum*로 동정된 임상분리균은 모두 2 주 (KIT 30101, 30102)이었고(도 4b), 이들의 염기서열과 표준균주인 *M. scrofulaceum* ATCC 19981의 염기서열 총 3주의 염기서열의 상동성을 비교하여 본 결과 모두 99.8 ~ 100%의 높은 염기서열 상동성을 나타냄을 확인하였다.

<52> D. *M. kansasii* 임상분리 균주의 동정

<53> *M. kansasii*는 비록 비결핵항산성균 중에서 전세계적으로 *M. avium* complex 분리균주 다음의 높은 빈도로 분리되어지는 균주로 알려져 있고, 또한 이들의 병원성은 비결핵항산성균 중에서 가장 높은 것으로 알려져 있다. 그렇지만 이들은 가장 대표적인 진단 표적인 16S rDNA의 염기상에서 비병원성균인 *M. gastri*와 100% 염기서열 상동성을 보이기 때문에 이 표적유전자를 이용한 방법으로는 이 두균의 감별이 불가능하다. 또한 *M. kansasii*는 최소한 5 개 이상의 아종으로 구성되어 있다고 알려져 있고 이들 중에서 유형 I과 유형 II가 임상 검체로부터 분리된다고 보고되고 있다. 본 발명에서 구축된 데이터베이스를 이용하여 임상분리 균주를 동정한 결과 모두 3 개의 균주가 *M. kansasii*로 동정되어, 생화학적인 분석법의 결과와 일치하는 결과이다. 본 발명에서 구축된 *hsp* 65 유전자 분절을 이용한 미코박테리움속 균주 동정 방법의 가장 큰 특징은 이들 *M. kansasii*를 *M. gastri*와 감별이 가능할 뿐만 아니라, 심지어 *M. kansasii*의 아종 수준으로도 동정이 가능하다는 것이다. 본 실험에서 분석한 3 주의 *M. kansasii* 임상분리 균주 (KIT 20118, 20119, 20120)는 모두 100% 염기서열 상동성을 보이며 *M. kansasii* Type I ATCC 12478으로 동정됨을 확인할 수 있었다(도 4c).

<54> *E. M. gordonae*, *M. szulgai*, *M. marinum*, *M. terrae* complex 임상분리 균주의 동정

<55> 본 발명에 의해 구축된 데이터베이스를 이용하여 동정하여 본 결과 4 개의 균주가 (KIT 32101, 32104, 32105, 32106) *M. gordonae*로 동정되었다(도 4a, 표 2). 이들 임상 분리 균주 4주 상호간 염기서열을 비교해 보면 99.2-99.8% 까지의 높은 염기서열 상동성을 나타내지만, 이들 균주를 표준 균주인 *M. gordonae* ATCC 14470과 염기서열의 상동성을 비교 분석하여 본 결과 이들은 95.5-96.3%으로 동일안 종내에서 상당히 낮은

상동성을 보여주었다. 이러한 사실은 *M. gordonae* 종안에 이질성이 존재한다는 기존의 보고와 일치하는 결과이다(Abed Y, Bollet C, de Micco P. Identification and strain differentiation of Mycobacterium species on the basis of DNA 16S-23S spacer region polymorphism. Res Microbiol. 1995 146(5): 405-13). 즉, 같은 지역에서 분리된 4 주 의 임상분리 균주는 높은 상동성을 보임에 반하여 다른 지역에서 유래된 표준균주와는 상당한 염기서열 차이를 보여준다는 것을 확인할 수 있었다.

<56> 데이터베이스를 이용한 결과, 4 개의 균주가 (KIT 31102, 31103, 31106, 31107) *M. szulgai*로 동정되었고, 이 결과는 생화학적인 검사결과와 일치하였다(도 4a, 표 2). 이들 염기서열과 표준균주인 *M. szulgai* ATCC 35799의 염기서열을 서로 비교하여 본 결과 모두 99.5-100% 까지의 높은 염기서열 상동성을 보여주었다.

<57> 본 데이터베이스에 의해 1 개의 균주가 *M. marinum*으로 동정되었고, 이 결과는 생화학적인 검사결과와 일치하였다(도 4a 및 표 2). 이 균주의 염기서열을 표준균주인 *M. marinum* ATCC 927의 염기서열과 서로 비교하여 보았을 때 99.3%의 염기서열 상동성을 보여주었다.

<58> *M. terrae* complex는 일반적으로 인간에게 병을 일으키지 않는 부생균으로 알려져 있고, 본 발명의 표준 균주 데이터베이스에 포함되어 있는 3 균주(*M. terrae*, *M. triviale*, *M. nonchromogenicum*)을 포함하여 여러 분류가 되어 있지 않

은 여러 균주로 구성되어 있다고 알려져 있다. 본 데이터베이스로 4 주가 *M. terrae* complex 중에서 *M. nonchromogenicum*으로 동정되었고, 이 결과는 생화학적인 검사결과에서 *M. terrae* complex로 동정된 결과와 100% 일치하는 결과를 보여주었다. 이들 균주를 표준균주인 *M. nonchromogenicum* ATCC 19530의 염기서열과 서로 비교하였을 때 이들은 95.0-100%까지의 염기서열 상동성을 보여주었다. 이러한 사실은 *M. terrae* complex 균주 사이에 이질성이 있다는 기존의 보고와 일치하는 결과이다.

<59> F. 신속발육균인 *M. fortuitum* complex와 *M. chelonae* complex 임상분리 균주의 동정

<60> 본 발명에서 얻어진 미코박테리움속 표준균주의 데이터베이스에 의해 2 주(KIT 61104, 61105)가 *M. chelonae* complex 균주중에 하나인 *M. abscessus*로 동정되었다. 이러한 결과는 생화학적인 결과와 일치하였으나, 생화학적인 동정 방법으로는 *M. chelonae* complex에 속하는 *M. chelonae* 와 *M. abscessus*를 서로 감별할 수 없었다. 그러나, *hsp 65* 유전자 염기서열 데이터베이스를 이용한 방법으로 이들의 감별이 가능하였다. 이 두 균주의 염기서열을 표준균주인 *M. abscessus* CAP97E-03와 비교하였을 때 98.4-99.5% 까지의 염기서열 상동성을 보여주었다.

<61> *M. fortuitum*은 본 방법에 의해 4 주가 동정되었고, 이는 생화학적인 결과와 일치하였다. *M. fortuitum* complex는 여러 가지 균주로 구성되어 있으며, 표준균주로는 *M. fortuitum* ATCC 6841, *M. fortuitum* ATCC 49403, *M. fortuitum* ATCC 49404, 및 *M. peregrinum*으로 구성되어 있는데 본 발명의 방법으로 4주 모두 *M. fortuitum* ATCC 6841로 동정됨을 확인할 수 있었다. 임상 분리 균주 4주의 염기서열을 *M. fortuitum* ATCC 6841과 비교하였을 때 99.4 ~ 100% 가지의 염기서열 상동성을 보임을 확인할 수 있었다.

<62> [실시예]

<63> 실시예 1: 표준 균주의 hsp 65의 644bp 분절의 제조

<64> 1-1) 균주 선정

<65> 상기 표 1에 나타난 균주들을 표준균주로 사용하였다. ATCC에서 분양받은 47주의 미코박테리움속 균주, 가톨릭의과대학의 나병연구소로부터 분양받은 *M. leprae*의 표준균주(Thai 53 strains), V Vincent로부터 분양받은 2 주의 *M. kansasii* 표준균주(type II, III)를 포함하여 총 50주의 미코박테리움속 표준균주로 정하였다. 또한, Tsukamurella 3주를 German Collection of Microorganisms and Cell Cultures로부터 분양왔고, *Nocardia* 1 주를 ATCC로부터 분양받아 hsp 65 유전자 분절의 염기서열을 분석하였다.

<66> 1-2) DNA 추출

<67> 비드 비터 페놀(Bead beater phenol, (BB/P)) 방법을 이용하여 표준균주 및 임상 분리균주의 DNA를 추출하였다. 균의 집락을 따내, TEN 완충액 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM: pH 8.0)에 부유시킨 후에 직경 0.1 mm 초자구 (diameter 0.1 mm; Biospec Products, Bartlesville, Okla., U.S.A.) 100 μ l (packing volume)와 페놀:클로로포름:이소프로필알콜 (50:49:1) 혼합용액 100 μ l를 함께 부유시켜 미니비터(mini beater)로 1분간 진탕하여 균체를 파쇄하였다. 균파쇄액은 12000 rpm으로 5 분간 원심 분리하고 상등액 (100 μ l)을 새로운 튜브에 옮긴 후, 60 μ l의 이소프로필알콜을 섞고, 다시 15000 rpm으로 15 분간 원심분리하였다. 침전물은 70% 에탄올로 세척한 후 TE (pH 8.0, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) 완충액 60 μ l로 DNA를 회수하였다.

<68> 1-3) hsp 65 유전자 증폭을 위한 프라이머 제조

<69> 모든 미코박테리움 속 균주의 *hsp 65* 유전자 분절을 증폭시킬 수 있는 특이적인 정방향 프라이머(HSPF3)와 역방향 프라이머(HSPR4)를 제조하여 사용하였다. 미코박테리움 속 균주 중에서 다른 목적으로 전체 1623-bp *hsp 65* 유전자의 염기서열이 분석된 *M. tuberculosis* (GenBank No. M15467), *M. avium* (GenBank No. AF281650) 2주의 염기서열과 계통학적으로 가장 유사한 *Tsukamurella*속 균주인 추가무렐라 파우라로메탈볼라(*T. paurometabola*)(GenBank No. AF352578) 1 주의 총 3주의 염기서열을 분석하여 모든 미코박테리움속 균주를 증폭시킬 수 있는 프라이머쌍을 제조하였다(도 1). SEQ ID NO: 1 및 2에서 본 발명의 바람직한 프라이머를 나타냈고, 도 1에 위치를 도시하였다.

<70> 역방향 프라이머: HSPF3

<71> 5' -ATGCCAAGGAGATCGAGCT-3'

<72> 역방향 프라이머: HSPR4

<73> 5' -AAGGTGCCGCGGATCTTGTT-3'

<74> 1-4) 중합효소연쇄반응에 의한 *hsp 65* 유전자 증폭

<75> PCR 반응은 2U의 Taq 폴리머라제, 10 mM dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂을 포함하는 AccuPower PCR PreMix (Bioneer, Korea)를 이용한다. 1-2)에서 추출한 주형 DNA 50 ng, 상기 1-3)에서 제조된 프라이머 HSPF3 및 HSPR4를 각각 20 pmol씩 넣고, 증류수를 최종 부피가 20 μ l가 되도록 첨가하여 혼합물을 만들었다. PCR은 첫 번째 변성은 95℃로 5분, 30 주기로 변성하고, 95℃ 1분 아닐링, 62℃ 45초 연장, 72℃ 1분 30초, 최종 연장은 72℃ 5분으로 수행하였다(Model 9600 thermocycler, Perkin-Elmer

cetus). 중합효소 연쇄반응 후, 1% 아가로스젤에 전기영동하여 644-bp의 반응산물을 확인하였다.

<76> 중합효소 연쇄반응 후, 1% 아가로스 젤에 전기영동하여 644 bp의 반응산물을 확인하였으며, 그 결과를 도 2에 나타냈다. 제 2도에서 나타낸 바와 같이, 본 실험에서 사용한 표준균주와 198 주의 임상분리 균주는 644-bp의 유전자 분절을 생산함을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 발명에서 제조한 프라이머 쌍을 이용한 PCR은 모든 미코박테리움 속 균주를 증폭시킬 수 있는 시스템이라고 할 수 있다. 도 2에서 패널A는 표준균주의 DNA 증폭산물을 나타낸 것으로서 구체적으로 다음과 같다.

<77> 라인M: 174를 *Hae*III 제한효소로 절단한 DNA 크기마커,

<78> 1: *M. tuberculosis*, 2: *M. bovis*,

<79> 3: *M. africanum*, 4: *M. avium*,

<80> 5: *M. intracellulare*, 5: *M. scrofulaceum*,

<81> 6: *M. gordonae*, 7: *M. szulgai*,

<82> 8: *M. marinum*, 9: *M. ulcerans*,

<83> 10: *M. celatum* Type I, 11. *M. genavense*,

<84> 12. *M. malmoense*, 13. *M. fortuitum* 6841,

<85> 14: *M. abscessus*, 15: *M. chelonae*,

<86> 16: *M. peregrinum*.

<87> 도 2에서 패널B는 국내 임상분리 균주의 DNA 증폭산물을 나타낸 것으로서 구체적으로 다음과 같다:

<88> 라인 M: 174을 *Hae*III 제한효소로 절단한 DNA 크기마커,

<89> 라인 1-4: Tbc - *M. tuberculosis* 임상분리 균주,

<90> 라인 5-7: Mac - *M. avium* complex의 임상분리 균주,

<91> 라인 8-10: Kac - *M. kansasii*의 임상분리 균주,

<92> 라인 11-13: Foc - *M. fortuitum*의 임상분리 균주,

<93> 라인 14-16: Chc - *M. chelonae*의 임상분리 균주이다.

<94> 1-5) 중합효소 연쇄반응 산물의 정제

<95> 1% 아가로스젤에 전기영동한 후에, PCR 증폭 산물 644-bp의 반응산물 부위의 젤을 잘라내서 새로운 튜브에 옮겨 DNA를 추출하였다. DNA 추출 및 정제는 Qiaex system(Qiagen, Germany)을 이용하였다. 젤 용해용액(Gel solubilizing solution) QX1 500 μ l을 젤을 포함한 튜브에 첨가한 후 50℃에 15분간 방치하여 젤을 완전히 녹인다. 그 후 젤 비드를 10 μ l을 첨가하여 완전히 섞은 후에 50℃에 15분간 방치하였다. 그 사이 1분 간격으로 튜브를 10초씩 vortex를 수행하여 비드가 골고루 퍼지도록 하였다. 이후 QX1으로 1회, QF로 2회 세척한 후 45℃에서 10분간 말린 후 TE 완충액 20 μ l로 DNA를 회수하였다.

<96> 실시예 2: *hsp 65* 유전자 분절의 염기서열 분석

<97> 염기서열 분석방법은 정방향 프라이머 HSPF3와 역방향 프라이머 HSPR4를 사용하여 양쪽으로 염기서열을 분석하였고, 프라이머 부위 40-bp를 제외한 총 604-bp (결핵균의 *hsp 65* 유전자를 기준으로 183 번째부터 806 번째 까지의 총 604 개의 염기서열)의 염기서열을 결정하였다.

<98> 자동 염기서열 분석은 젤 용출산물을 주형 DNA로 사용하였다. 주형DNA 1060 ng, 프라이머 1.2 pmol, BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (PE Applied Biosystems) 2 μ l을 섞고, 증류수를 첨가하여 총 부피 10 μ l로 제조하였다. 반응은 Perkin Elmer Cetus 9600을 사용하여, 95℃ 10 초, 60℃ 10 초, 60℃ 4 분으로 25 주기로 실시하였다. 반응이 끝난 시료에 에탄올을 첨가하여 DNA를 침전시켜 정제하였다. 즉, 증류수 180 μ l, 3 M 소듐아세테이트 10 μ l를 첨가하여 총 200 μ l로 만든 후, 이 혼합물에 2배 부피의 100 % 에탄올을 첨가하여 잘 섞은 다음 15000 rpm으로 20분간 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. 그 후 70% 에탄올 500 μ l을 첨가한 후 15000 rpm으로 20분간 원심분리하여 DNA를 세척하였다. 그 후 DNA를 탈이온 포름아미드(PE Applied Biosystems)로 회수하였다. 이렇게 정제된 DNA를 95℃로 5분간 반응하여 단일가닥 DNA로 만든 후, ABI 3100 system을 이용하여 2시간 30분 동안 전기영동하여 염기서열을 분석하였다.

<99> 그 결과, 54 주의 표준 균주의 604-bp hsp 65 유전자 염기서열은 Genbank 검색상에서 모두 새로운 염기서열임을 확인할 수 있었다.

<100> 실시예 3: hsp 65 604-bp 유전자 분절의 염기서열배열 및 계통수 작성

<101> 3-1) 염기서열배열

<102> 자동 염기서열 분석방법에 의해 분석되어진 54주의 표준균주의 hsp 65 604-bp의 염기서열배열을 Dnastar소프트웨어의 Megalign 프로그램을 이용하여 다정렬(multialignment)하고 hsp 65 유전자의 염기서열의 데이터베이스를 구축하였다. 다정렬은 일단 604-bp염기서열을 Megalign 프로그램에서 301개의 아미노산으로 번역시킨 후, 이 아미노산을 대상으로 Megalign 프로그램안의 Clustal Method 방법으로 다정렬키는 것

이다. 이렇게 정렬된 101개의 아미노산을 다시 604개의 염기서열로 변화시켜 미코박테리움 동정 데이터베이스를 구축하였다.

<103> 표준균주 염기서열 각각에 대한 염기서열 상동성은 다정렬된 데이터베이스를 Megalign 프로그램 안의 서열거리(sequence distance)를 이용하여 분석하였다.

<104> 미코박테리움속 표준균주 50 주를 포함한 총 54 주의 표준 균주 염기서열을 직접 염기서열 분석 방법으로 분석한 후 얻어진 결과를 다정렬 (multialignment) 하여 서로의 염기서열을 비교해 본 결과, 첫째 54 주 표준균주는 결핵균군속 균주 5주 즉 *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. microti*, *M. tuberculosis*를 제외한 나머지 균주들은 모두 다른 염기서열을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

<105> 3-2) 계통수 작성

<106> 미코박테리움속 표준균주 사이의 계통학적 관계(phylogenetic relationship)는 계통수 (phylogenetic tree)를 완성하여 분석하였다. 계통수는 MEGA 소프트웨어를 이용하여 구축되었다. 다정렬된 50주의 미코박테리움 속 표준균주의 604-bp 염기서열을 *T. paurometabola* 의 604-bp의 hsp 65 유전자 염기서열을 outgroup으로 사용하여 Juke-Cantor distance estimation 방법과 pair wise deletion 방법에 기초를 둔 Neighbor-Joining 계통수를 구축하였다. Bootstrap 분석은 100 복제로 수행되었다.

<107> 미코박테리아 균주 50 주가

*T. paurometabola*을 outgroup 으로 할 때 하나의 큰 그룹을 형성하고, 완속발육균과 신속발육균이 서로 완전히 다른 그룹을 형성하고 있음을 확인하였고, 명백한 절대병원성균인 *M. tuberculosis*와 *M. leprae*가 서로 같은 분절을 형성하고, 또한 비결핵항산성균주 중에서 가장 빈번히 분리되고, 또한 생화학적인 특성이 거의 비슷한 *M. avium*과 가 서로 같은 분절을 형성하는 등 미코박테리아의 일반적인 특성을 잘 반영하고 있음을 확인하였다. 또한 본 계통수의 가장 큰 특성은 16S rDNA 분석방법으로는 100% 염기서열 상동성을 보이기 때문에 감별이 불가능한 *M. kansasii*와 *M. gastri* 와의 구별 뿐만 아니라, *M. kansasii* 사이에서의 subspecies 가지의 구별도 가능함을 확인하였다 (즉 *M. kansasii* Type I, II, III의 염기서열이 서로 차이를 보이고 있다)(도 3).

- <108> 실시예 4: 표준균주 데이터베이스를 이용한 비교염기서열 분석방법에 의한 임상 분리 균주 동정 실시
- <109> 하기 표 2에 나타난 바와 같이, 결핵연구원(대한민국, 서울)에서 생화학적인 방법에 의해 균동정이 완료된 결핵균 10 주와 비결핵항산성균 28 주를 포함하여 총 38 주의 균주를 임상분리균주로 하였다.
- <110> 임상분리균주의 DNA 분리, PCR에 의한 증폭, 및 정제방법은 실시예 1-2) 내지 1-5)에 기재된 방법과 동일하게 수행하고, 실시예 2와 동일한 방법으로 각 임상분리균주의 hsp 65 604-bp 분절의 염기서열을 분석하였다. 표준균주 54 주의 염기서열이 축적되어 있는 Dnastar 소프트웨어의 Megalign 프로그램에 대입한 후 실시예 3에 기재된 방법으로 다정렬을 수행한 후, Mega 소프트웨어의 Neighbor-Joining 방법으로 계통수를 완성하여 균 동정을 실시하였다. 그 결과는 상기 표 2에 나타난 것과 같았다.

- <111> 표 2 및 도 4a, 4b, 4c 및 4d에 나타냈으며, 38 주의 균주는 모두 100% 민감도와 특이도를 가지고 종수준으로 동정함을 확인할 수 있었다. 도 4a, 4b, 4c, 및 4d에 대해서는 다음과 같다.
- <112> 도 4a: *M. gordonae* 4 주 (KIT 32101, 32104, 32105, 32106), *M. szulgai* 4 주 (KIT 31102, 31103, 31106, 31107) 및 *M. marinum* 1주 (KIT 21101)의 동정
- <113> 도 4b: *M. scrofulaceum* 2 주 (KIT 30101, 30102) 및 *M. avium* complex 4 주 (KIT 41105, 41110, 41111, 41115)의 동정
- <114> 도 4c: *M. tuberculosis* 1주 (KIT 77710), *M. kansasii* 3 주 (KIT 20118, 20119, 20120) 및 *M. terrae* complex 4주 (KIT 47101, 47102, 47103, 47104)의 동정
- <115> 도 4d: *M. chelonae* complex 2 주 (KIT 61104, 61105) 및 *M. fortuitum* 4 주 (KIT 60108, 60109, 60110, 60111)의 동정.
- <116> a) *M. tuberculosis* 검체의 동정과 관련하여, 20 주 모두 결핵균으로 동정됨을 확인할 수 있었다 (표2 및 도 4b). 이들 임상분리 결핵균 20 주의 염기서열은 표준 균주인 *M. tuberculosis* ATCC 27284와 100% 염기서열 상동성을 보임을 확인할 수 있었다.
- <117> b) *M. avium* complex 임상 분리 균주의 동정과 관련하여, *M. avium* complex 임상 분리 균주 4 주를 대상으로 균 동정을 수행해 본 결과 이들 중 3 주는 *M. intracellulare*와 1 주는 *M. avium*으로 동정할 수 있었다. 본 발명에 의해 개발된 방법으로 *M. avium*으로 동정된 1 주 (KIT 41110)는 표준 균주인 *M. avium* ATCC 25281과 염기서열을 비교하여 보았을 때 전체 604-bp 중에서 3 개의 염기에서 다른 즉 99.5% 염기서열 상동성을 보임을 확인할 수 있었다. *M. intracellulare*로 동정된 3주 (KIT 41105,

41111, 41115)와 표준균주인 *M. intracellulare* ATCC 13850 4 주의 염기서열의 상동성을 비교하여 보았을 때 서로 99.0-99.8%의 염기서열 상동성을 보임을 확인할 수 있었다.

<118> c) *M. scrofulaceum* 임상분리 균주의 동정과 관련하여, *M. scrofulaceum*으로 동정된 임상분리균은 모두 2 주 (KIT 30101, 30102)이었고(도 4b), 이들의 염기서열과 표준균주인 *M. scrofulaceum* ATCC 19981의 염기서열 총 3주의 염기서열의 상동성을 비교하여 본 결과 모두 99.8-100%의 높은 염기서열 상동성을 보임을 확인하였다.

<119> d) *M. kansasii* 임상분리 균주의 동정과 관련하여, 모두 3 개의 균주가 *M. kansasii*로 동정되었다. 이 결과는 생화학적인 결과와 일치하는 결과이다. 본 실험에서 분석된 3 주의 *M. kansasii* 임상분리 균주 (KIT 20118, 20119, 20120)는 모두 100% 염기서열 상동성을 보이며 *M. kansasii* Type I ATCC 12478으로 동정됨을 확인할 수 있었다(도 4c).

<120> e) *M. gordonae*, *M. szulgai*, *M. marinum*, *M. terrae* complex 임상분리 균주의 동정과 관련하여, 4 개의 균주가 (KIT 32101, 32104, 32105, 32106) *M. gordonae*로 동정되었다(도 4a 및 표 2). 이들 임상 분리 균주 4 주의 염기서열 서로 비교해 보면 서로 99.2-99.8% 까지의 높은 염기서열 상동성을 보여 주지만, 이 들 균주를 표준 균주인 *M. gordonae* ATCC 14470과 염기서열의 상동성을 비교 분석하여 본 결과 이들은 95.5-96.3% 까지의 같은 종 안의 균으로서는 상당히 낮은 상동성을 보여주었다.

<121> 데이터베이스를 이용한 결과 4 개의 균주가 (KIT 31102, 31103, 31106, 31107) *M. szulgai*로 동정되었고, 이 결과는 생화학적인 검사결과와 일치하였다(도 4a, 및 표 2). 이들 염기서열과 표준 균주인 *M. szulgai* ATCC 35799의 염기서열을 서로 비교하여 본 결과 모두 99.5-100% 까지의 높은 염기서열 상동성을 보여주었다.

- <122> 본 발명에 따른 데이터베이스에 의해 1 개의 균주가 *M. marinum*으로 동정되었고, 이 결과는 생화학적인 검사결과와 일치하였다(도 4a, 표 2). 이 균주의 염기서열을 표준 균주인 *M. marinum* ATCC 927의 염기서열과 서로 비교하여 보았을 때 99.3%의 염기서열 상동성을 보여주었다.
- <123> 본발명에 따른 데이터베이스로 4 주가 *M. terrae* complex 중에서 *M. nonchromogenicum*으로 동정되었고, 이 결과는 생화학적인 검사결과에서 *M. terrae* complex로 동정된 결과와 100% 일치하는 결과를 보여주었다. 이들 균주를 표준균주인 *M. nonchromogenicum* ATCC 19530의 염기서열과 서로 비교하였을 때 이 들은 95.0-100%까지의 염기서열 상동성을 보여 주었다. 이러한 사실은 *M. terrae* complex 균주 사이에 heterogeneity가 있다는 기존의 보고와 일치하는 결과이다.
- <124> f) 신속발육균인 *M. fortuitum* complex와 *M. chelonae* complex 임상분리 균주의 동정과 관련하여, 본발명의 데이터베이스에 의해 2 주 (KIT 61104, 61105)가 *M. chelonae* complex 균주 중에 하나인 *M. abscessus*로 동정되었다. 이러한 결과는 생화학적인 결과와 일치하였으나, 생화학적인 동정 방법으로는 *M. chelonae* complex에 속하는 *M. chelonae* 와 *M. abscessus*를 서로 감별할 수 없었다. 그러나, *hsp 65* 유전자 염기서열 데이터베이스를 이용한 방법으로 이 들의 감별이 가능하였다. 이 두 균주의 염기서열을 표준 균주인 *M. abscessus* CAP97E-03와 비교하였을 때 98.4-99.5%까지의 염기서열 상동성을 보여주었다.
- <125> *M. fortuitum*은 본 방법에 의해 4 주가 동정되었고, 역시 생화학적인 결과와 일치하였다. 표준균주로는 *M. fortuitum* ATCC 6841, *M. fortuitum* ATCC 49403, *M. fortuitum* ATCC 49404 및 *M. peregrinum*으로 구성되어 있는데 본 방법으로는 4 주 모두 *M.*

fortuitum ATCC 6841로 동정됨을 확인할 수 있었다. 임상 분리 균주 4주의 염기서열을 ATCC 6841과 비교하였을 때 99.4-100% 가지의 염기서열 상동성을 보임을 확인할 수 있었다.

【발명의 효과】

<126> 본 발명은 미코박테리움속 균주의 동정에 이용될 수 있는 hsp 65 유전자의 604-bp 분절을 나타내는 폴리뉴클레오타이드를 제공하여, 비교염기서열 분석방법, 프로브혼성화법, 및 PCR-RFLP등의 방법에 이용가능하고, 또한, hsp 65 유전자의 604-bp 분절을 이용한 동정법은 이들을 이용한 미코박테리움속의 균주를 동정하는 방법을 제공하여, 생장속도가 느리고 다양한 균주가 존재한다는 문제점, 그리고 물질위주 동정 및 16s rDNA 동정이 갖는 문제점을 해결하여, 간편하고, 경제적이고 정확성이 높은 동정방법을 제공한다는 장점이 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

SEQ ID NO: 1 내지 SEQ ID NO: 54에 나타난 염기서열로 이루어진 군에서 선택되며, 미코박테리움속 균주의 hsp 65 유전자의 604-bp 분절을 나타내는 폴리뉴클레오타이드.

【청구항 2】

SEQ ID NO: 1 내지 SEQ ID NO: 54에 나타난 염기서열로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상의 미코박테리움 균주의 hsp 65의 604bp 분절을 포함하는, 미코박테리움속 균주의 탐지 또는 동정을 위한 뉴클레오타이드 세트.

【청구항 3】

- (1) 미코박테리움속 균주의 hsp 65 유전자의 604-bp 분절을 특이적으로 증폭시키는 프라이머를 이용하여, 목적 균주의 hsp 65 유전자 분절을 증폭하고,
- (2) 상기 증폭된 hsp 65 유전자 분절의 염기서열을 분석하고,
- (3) 단계 (2)에서 얻어진 목적 균주의 hsp 65 604-bp 분절의 염기서열과, 미코박테리움 표준균주의 hsp 65 604-bp 분절의 염기서열을 비교하여, 미코박테리움속 균주의 탐지 또는 동정하는 방법.

【청구항 4】

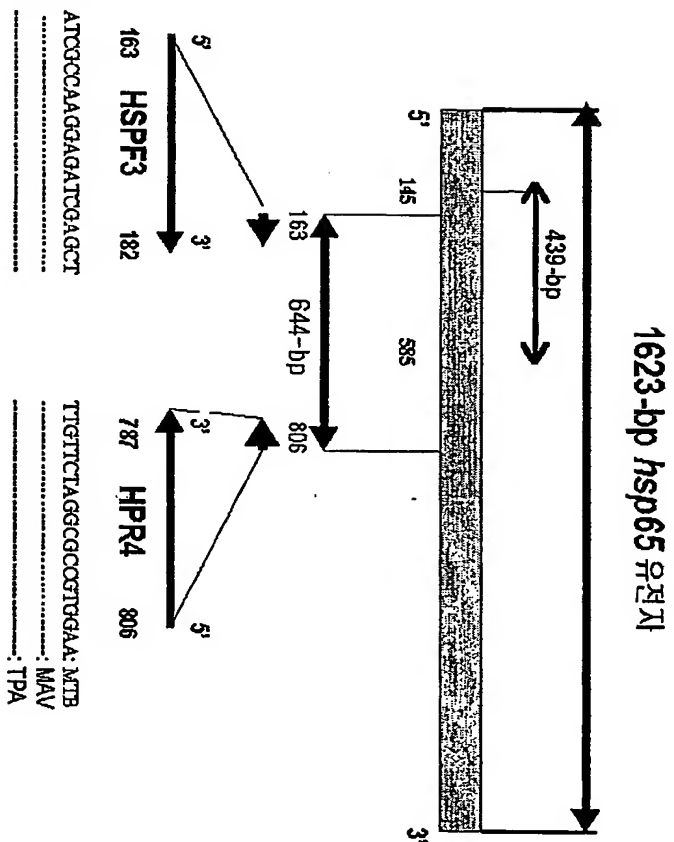
제 3 항에 있어서, 상기 프라이머는 SEQ ID NO: 55 내지 SEQ ID NO: 56에 나타난 서열을 갖는 프라이머쌍인 방법.

【참구항 5】

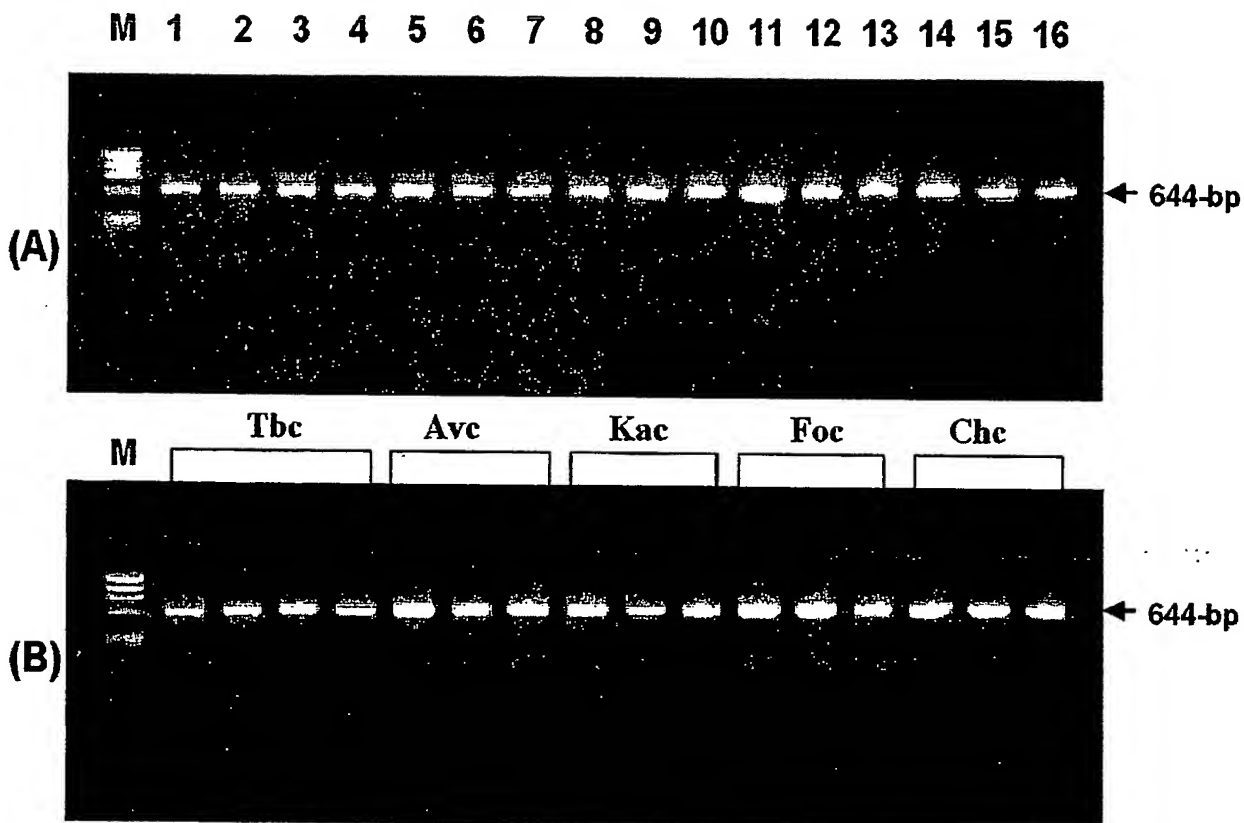
제 3 항에 있어서, 상기 단계 (3)에서 목적균주의 hsp 65 유전자 604-bp 분절의 염기서열과, 제 2항에 따른 폴리뉴클레오타이드 세트의 염기서열에 대입하여 다정렬 (multialignment)한 후에 계통도를 완성하여 미코박테리움속 균주를 탐지 또는 동정하는 방법.

【도면】

【표 1】

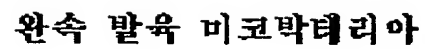


【도 2】



BEST AVAILABLE COPY

【도 3a】



【도 3b】



Outgroup

Scale: each - is approximately equal to the distance of 1.386123

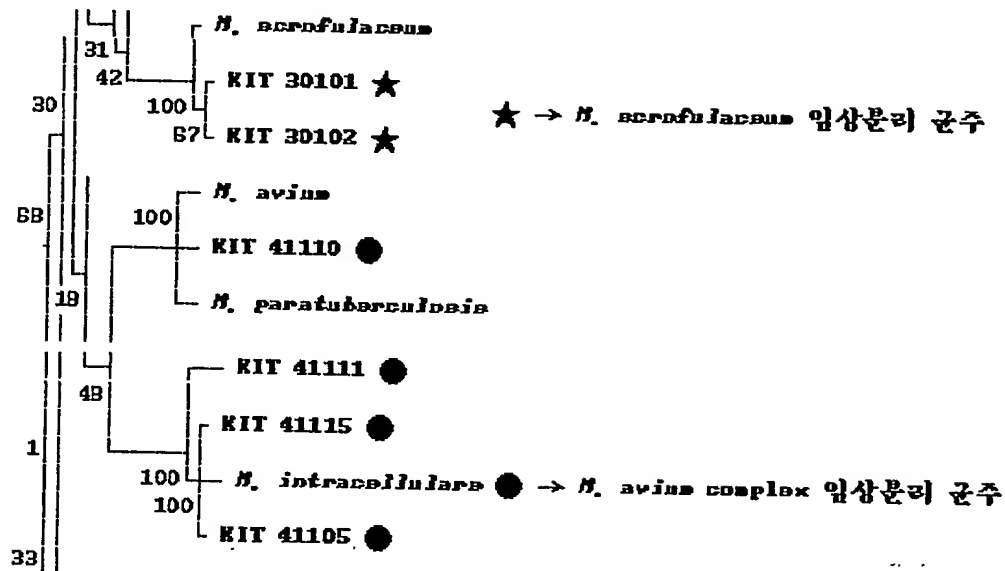
【도 4a】



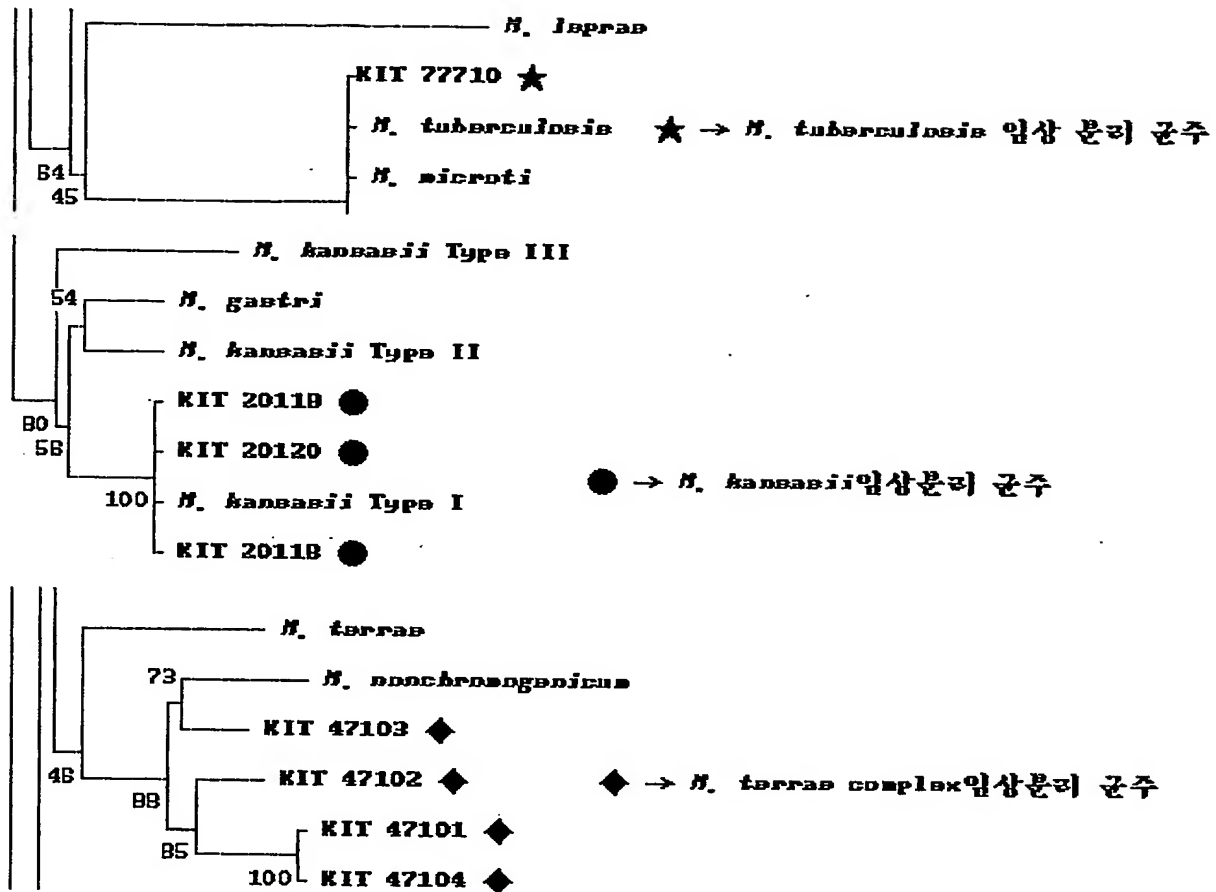
● → M. Bxujgaj 임상분리 군주

◆ → *M. maximum* 임상분리 균주

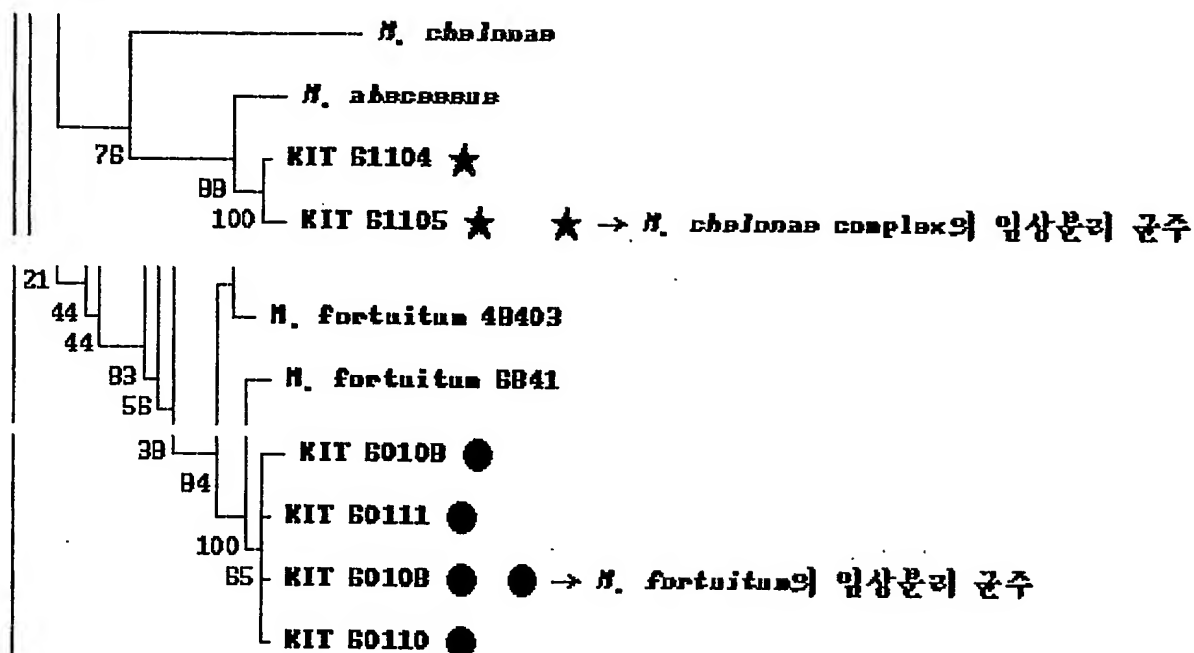
【도 4b】



【도 4c】



【도 4d】



【서열목록】

<110> KIM, Bum-Joon <120> HSP 65 GENE FRAGMENTS, AND METHOD OF IDENTIFYING
MYCOBACTERIAL SPECIES WITH THE SAME <160> 56 <170> KopatentIn 1.71 <
210> 1 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium abscessus <400> 1
ggaggacccg tacgagaaga tcggcgctga gctggtcaag gaagttgcca agaagaccga 60
cgacgtcgcg ggtgacggca ccaccaccgc caccgtgctc gccaggctc tggtaagga 120
aggtctgcgt aacgtcgccg ccggcgccaa cccgctcggc ctgaagcgcg gtatcgagaa 180
ggccgtcgag aaggtcaccg agacgtgct gaagagcgcc aaggaggtcg agaccaagga 240
gcagatcgcg gccacggccg gtatctccgc gggcgaccag tccatcggcg acctgatcgc 300

cgaggccatg gacaaggttg gtaacgaggg tgtcatcacc gtcgaggagt ccaacacctt 360
 cggcctgcag ctggagctca ccgagggtat gcgcttcgac aagggtctaca tctcgggcta 420
 ctctgtgacc gacgccgagc gtcaggaagc cgtcctggag gatccctaca tcctgtctggt 480
 cagctccaag gtgtcgaccg tcaaggatct gcttccgttg ctggagaagg tcattcaggc 540
 cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaggctctct ccactctggt 600 cgtc
 604 <210> 2 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium africanum <400>

2 ggaggatccg tacgagaaga tcggcgccga gctggtcaaa gagtagcca agaagaccga 60
 tgaçgtcgcc ggtgacggca ccacgacggc caccgtgctg gccagggcgt tggttcgca 120
 gggcctgcgc aacgtcgcg cggcgccaa cccgtcggt ctcaaacgcg gcatcgaaaa 180
 ggccgtggag aaggtcaccg agaccctgct caaggcgcc aaggaggtcg agaccaagga 240
 gcagattgcg gccaccgcag cgatttcggc gggtgaccag tccatcggtg acctgatcgc 300
 cgaggcgatg gacaaggtgg gcaacgaggg cgtcatcacc gtcgaggagt ccaacacctt 360
 tgggctgcag ctcgagctca ccgagggtat gcggttcgac aagggtctaca tctcggggta 420
 ctctgtgacc gaccggagc gtcaggaggc ggtcctggag gaccctaca tcctgtctggt 480
 cagctccaag gtgtccactg tcaaggatct gctgccgctg ctcgagaagg tcacggagc 540
 cggtaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaggcgctgt ccaccctggt 600 cgtc
 604 <210> 3 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium asiaticum <400>

3 ggaggacccg tacgagaaga tcggcgccga gctggtcaag gaagtcgcca agaagaccga 60
 cgacgtggcc ggtgacggca ccacgacggc caccgtgctg gcacaggcgc tggtaagga 120
 gggcctgcgc aacgttgccg caggcgccaa cccgtgggc ctgaagcgcg gcatcgagaa 180
 ggccgtcgag aaggtcaccg agaccctgct cagctcgcc aaggacgtcg agaccaagga 240

gcagatcgcg gccaccgagg gtatttccgc gggcgaccag tcgatcggcg acctgatcg 300
 cgaggcgatg gacaaagtcg gcaacgaggg tgtcatcacc gtcgaggagt ccaacacctt 360
 cggcctgcag ctcgagctca ccgagggcat gcggttcgac aagggttaca tctcgggcta 420
 cticgtcacc gacgccgagc gtcaggaagc cgtcctggag gacccctaca tcctgctggt 480
 ttccagcaag gtgtcgaccg tcaaggacct gctgccgctg ctggagaagg tcattccaggc 540
 cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaggcgctgt ccaccctggt 600 cgtc
 604 <210> 4 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium aichiense <400>

4 cgaggacccg tacgagaaga tcggcgctga gctgggtcaag gaagtcgcca agaagactga 60
 cgatgtcgcg ggcgacggca ccaccaccgc caccgtgctc gtcaggctc tgggttcgca 120
 aggtctgcgc aacgtcgctg ccggcgccaa cccgctcggc ctgaagcgcg gcatcgagaa 180
 ggccgtcgag aagatcaccg agacgtcct caagagcgcc aaggaggtcg agaccaagga 240
 ccagatcgcg gccaccgccg ggatctccgc gggcgaccag accatcggtg acctgatcg 300
 cgaggccatg gacaaggtcg gcaacgaggg tgtcatcacc gtcgaggagt cgaacacctt 360
 cggcctgcag ctcgagctca ccgagggat gcgcttcgac aagggttaca tctcgggtta 420
 cticgtgacc gacgccgagc gtcaggaagc ggtcctcgag gatccgtaca tcctgctggt 480
 gtcgtcgaag gtctcgaccg tcaaggacct gcttccttg ctggagaagg tcattcagtc 540
 gggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaagccctgt ccaccctggt 600 ggtc
 604 <210> 5 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium avium <400> 5

ggaggacccg tacgagaaga tcggcgccga gctgggtcaag gaagtcgcca agaagaccga 60
 cgacgtcgcc ggtgacggca cgacgacggc caccgtgctc gccaggcgt tgggtccgca 120
 gggcctgcgc aacgtcgcg ccggcgccaa cccgctgggt ctcaagcgcg gcatcgagaa 180

ggccgtcgag aaggtcaccg agaccctgct caagtcggcc aaggaggtcg agaccaagga 240
 ccagatcgct gccaccgcgg ccatctccgc gggcgaccag tcgatcggcg acctgatcgc 300
 cgaggcgatg gacaaggtcg gcaacgaggg cgtcatcacc gtcgaggagt ccaacacctt 360
 cggcctgcag ctcgagctca ccgagggtat gcggttcgac aagggttaca tctcgggcta 420
 cttcgtcacc gacgccgagc gtcaggaagc cgtcctcgag gatccgttca tcctgctggt 480
 cagctccaag gtctcgaccg tcaaggacct gctgccgctg ctggagaagg tcatccaggc 540
 cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaggccctgt ccaccctggt 600 cgtc

604 <210> 6 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium bovis <400> 6

ggaggatccg tacgagaaga tcggcgccga gctggtcaaa gaggtagcca agaagaccga 60
 tgacgtcgcc ggtgacggca ccacgacggc caccgtgctg gcccaggcgt tggttcgcga 120
 gggcctgcgc aacgtcgcg gggcgccaa cccgctcggt ctcaaacgcg gcatcgaaaa 180
 ggccgtggag aaggtcaccg agaccctgct caagggcgcc aaggaggtcg agaccaagga 240
 gcagattgct gccaccgcag cgatttcggc gggtagaccag tccatcggtg acctgatcgc 300
 cgaggcgatg gacaaggtgg gcaacgaggg cgtcatcacc gtcgaggagt ccaacacctt 360
 tgggctgcag ctcgagctca ccgagggtat gcggttcgac aagggttaca tctcggggta 420
 cttcgtgacc gaccggagc gtcaggaggg ggtcctggag gaccctaca tcctgctggt 480
 cagctccaag gtgtccactg tcaaggatct gctgccgctg ctgagaagg tcatcgagc 540
 cggtaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaggcctgt ccaccctggt 600 cgtc

604 <210> 7 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium bovis BCG <400> 7

ggaggatccg tacgagaaga tcggcgccga gctggtcaaa gaggtagcca agaagaccga 60
 tgacgtcgcc ggtgacggca ccacgacggc caccgtgctg gcccaggcgt tggttcgcga 120

gggcctgcg c aacgtcgcg c cggcgccaa cccgctcgg ctcaaacgc gcatcgaaaa 180
 ggccgtggag aaggtcacc agaccctgct caagggcgcc aaggaggtcg agaccaagga 240
 gcagattgcg gccaccgcag cgatttcggc gggtgaccag tccatcgggtg acctgatcgc 300
 cgaggcgatg gacaaggtgg gcaacgaggg cgtcatcacc gtcgaggagt ccaacacctt 360
 tgggctgcag ctcgagctca ccgagggtat gcggttcgac aagggtctaca tctcggggta 420
 cttcgtgacc gacccggagc gtcaggaggg ggtcctggag gacccctaca tcctgctggt 480
 cagctccaag gtgtccactg tcaaggatct gctgccgctg ctcgagaagg tcacgaggagc 540
 cggttaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaggcgctgt ccacctggt 600 cgtc
 604 <210> 8 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterim celatum Type 1 <400>

8 ggaggacccc tacgaaaaga tcggcgccga gctggtcaag gaagtcgcca agaagaccga 60
 cgacgtcgcg ggtgacggta cgacgacggc cacggtgctg gccaggcgcg tggtaagga 120
 gggcctgcg c aacgtcgcc c cggcgccaa cccgctcggc ctgaagcgcg gcatcgagaa 180
 ggccgtcgag aaggtcacc agacgtgct caagggcgcc aaggaggtcg agaccaagga 240
 gcagattgct gccaccgcgg ccattctcgc cggcgaccag tcgatcggcg acctgatcgc 300
 cgaggccatg gacaaggtcg gcaacgaggg cgtcatcacc gtcgaggagt ccaacacctt 360
 cggcctgcag ctcgagctca ccgagggtat gcgcttcgac aagggtctaca tctcgggtta 420
 cttcgtcacc gacgccgagc gtcaggaggg ggtgctcgag gagccgtaca tcctgctggt 480
 cagctccaag gtgtcgacgg tcaaggacct gcttccgctg ctggagaagg tcacccaggc 540
 cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaagccctct ccacctggt 600 cgtc

604 <210> 9 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobaterium celatum TypeII <400>

9 ggaggacccc tacgagaaga tcggcgccga gctggtcaag gaagtcgcca agaagaccga 60

cgacgtcgcg ggtgacggta cgacgacggc caccgtgctg gccagggcg tggtcaagga 120
 aggcctgcgc aacgtcgccg ccggtgccaa cccgtcggc ctgaagcgcg gtatcgagaa 180
 ggccgtcgag aaggtcaccg agacgtgct caagggcgcc aaggaggtcg agaccaagga 240
 gcagatcgct gccaccgagg ccatctccgc cggtagaccag tcgatcggcg acctgatcgc 300
 cgaggcgatg gacaaggtcg gcaacgaggg cgtcatcacc gtcgaggagt ccaacacctt 360
 cggcctgcag ctcgagctca ccgagggtat gcgcttcgac aagggttaca tctcgggtta 420
 cttcgtcacc gacgccgagc gtcaggaggc ggtgctcgag gagccctaca tcctgctggt 480
 cagctccaag gtgtcgacgg tcaaggatct gctgccgctg ctggagaagg tcatccaggc 540
 cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggt gaggcgttga gcacctggt 600 cgtc

604 <210> 10 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium chelonae <400>

10 ggaggacccg tacgagaaga tcggcgctga gctgggtcaag gaagttgcca agaagactga 60

cgacgtcgcg ggtgacggca ctactaccgc caccgtgctt gccagggctc tggtcaagga 120
 aggtctgctg aacgtcgctg ccggcgccaa cccgtcggc ctgaagcgcg gcatcgagaa 180
 ggccgtggag gccgtcacca gctctctgct ggactccgcc aaggagatcg acaccaagga 240
 gcagatcgcg gccaccgagg gcatctccgc gggtgaccag tccatcggtg atctgatcgc 300
 cgaggccatg gacaaggtcg gcaacgaggg tgtcatcacc gtcgaggagt ccaacacctt 360
 cggcctgcag ctggagctca ccgagggtat gcgcttcgac aagggttaca tctcgggtta 420
 cttcgtgacc gacgccgagc gtcaggaagc cgtcctggag gatccctaca tcctgctggt 480
 cagctccaag gtctcgaccg tcaaggacct acttcccttg ctggagaagg tcatccaggg 540
 cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgttgagggc gaggctctct cgacctggt 600 cgtc

604 <210> 11 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium chitae <400> 11

ggaggacccg tacgagaaga tcggcgccga gctgggtcaag gaagtcgccga agaagactga 60
 cgacgtcgcc ggcgacggca ccaccaccgc caccgttctg gcccaggcgc tggttcgca 120
 aggtctgcgc aacgtcgcg cggcgccaa cccgtcggc ctgaagcgc gcatcgagaa 180
 ggccgtcgag accgtctcgg agaacctgct caagtcggcc aaggaggtcg agaccaagga 240
 gcagatcgcc gccaccgccg ggatctccgc gggcgacacc accatcgggtg acctgatcgc 300
 cgaggccatg gacaaggtgg gcaacgaggg tgtcatcacc gtcgaggagt ccaacacctt 360
 cggcctgcag ctggagctca ccgaggcat gcgcttcgac aagggtaca tctcgggcta 420
 ctfcgtgacc gacgccgagc gtcaggaagc cgtcctggag gatccctaca tcctgctggt 480
 cagctcgaag atctcgaccg tcaaggacct gctgccgctg ctggagaagg tcatccagtc 540
 cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaggccctgt cgaccctggt 600 ggtc

604 <210> 12 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium microti <400>

12 ggaggatccg tacgagaaga tcggcgccga gctgggtcaaa gaggtagcca agaagaccga 60
 tgacgtcgcc ggtgacggca ccacgacggc caccgtgctg gcccaggcgt tggttcgca 120
 gggcctgcgc aacgtcgcg cggcgccaa cccgtcgggt ctcaaacgcg gcatcgaaaa 180
 ggccgtggag aaggtcaccg agacctgct caaggcgcc aaggaggtcg agaccaagga 240
 gcagattgcg gccaccgcag cgatttcggc gggtgaccag tccatcgggtg acctgatcgc 300
 cgaggcgatg gacaaggtgg gcaacgaggg cgtcatcacc gtcgaggagt ccaacacctt 360
 tgggctgcag ctcgagctca ccgagggtat gcggttcgac aagggtaca tctcggggta 420
 ctctgtgacc gaccgggagc gtcaggaggc ggtcctggag gaccctaca tcctgctggt 480
 cagctccaag gtgtccactg tcaaggatct gctgccgctg ctcgagaagg tcatcggagc 540
 cggtaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaggcgctgt ccaccctggt 600 cgtc

604 <210> 13 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobaterium flavescens <400>

13 ggaggacccg tacgagaaga tcggcgctga gctggtcaag gaagtcgcca agaagaccga 60
 cgacgtcgcg ggcgacggca ccaccaccgc caccgtgctg gcccaggcgc tcgtgcgcga 120
 gggctctgcgc aacgtcgcgg ccggcgccaa cccgatggcg ctgaagcgcg gtatcgagaa 180
 ggccgtcgag aaggtcaccg agacgtgct gaagtcggcc aaggaggtcg agaccaagga 240
 gcagatcgct gccaccgccg cgatctcggc gggcgacacc cagatcgga agctgatcgc 300
 cgaggccatg gacaaggtcg gcaacgaggg tgtcatcacc gttgaggagt ccaacacctt 360
 cgggctgcag ctcgagctca ccgagggtat gcgcttcgac aagggttaca tctcgggtta 420
 ctctgtgacc gacgccgagc gtcaggaagc ggtcctcgag gatccctgca tcctgctcgt 480
 gtcgtccaag gtgtcgaccg tcaaggatct gtcgccgttg ctggagaagg tcattcaggc 540
 cggcaagccg gtgctgatca tcgccgagga cgtcgagggt gaggccctgt cgaccctggt 600 ggtc

604 <210> 14 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobaterium fortuitum 6841

<400> 14 ggaggacccg tacgagaaga tcggcgctga gctcgtcaaa gaggtcgcca agaagaccga
 60 cgacgtcgcg ggcgacggca ccaccaccgc caccgttctg gcacaggccc tggttcgtga 120
 aggtctgcgc aacgtcgctg ccggcgccaa cccgctcggc ctgaagcgcg gcatcgagaa 180
 ggccgtcgag aaggtcaccg agacgtgct gaagagcgcc aaggaggtgg agaccaagga 240
 gcagatcgct gccaccgccg gtatctcgc cggtagaccag tccatcggtg acctgatcgc 300
 cgaggccatg gacaaggtcg gcaacgaggg tgtcatcacc gtcgaggaga gcaacacctt 360
 cggcctgcag ctggagctca ccgggggtat gcgcttcgac aagggttaca tctcgggcta 420
 ctctgtgacc gacgccgagc gtcaggaagc cgtcctggag gatccctaca tcctgctggt 480
 cagctccaag gtctcgaccg tcaaggacct gtcgccgttg ctggagaagg tcatccagtc 540

cggcaagccg ctgctgatca tgcgcgagga cgtcgagggc gaagccctgt cgaccctggc 600 ggtc
 604 <210> 15 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium fortuitum 49403 <
 400> 15 ggaggacccg tacgagaaga tcggcgctga gctcgtcaaa gaggtcgcca agaagaccga
 60 cgacgtcgcg ggcgacggca ccaccaccgc caccgttctg gcccaggccc tggttcgca 120
 aggtctgcgc aacgtcgctg ccggcgccaa cccgctcggc ctgaagcgcg gcatcgagaa 180
 ggccgtcgag aaggtcaccg agacgtgct gaagagcgcc aaggaggtgg agaccaagga 240
 gcagatcgct gccaccgccg gtatctccgc cggtagaccag tccatcggtg acctgatcgc 300
 cgaggccatg gacaaggtcg gcaacgaggg tgtcatcacc gtcgaggaga gcaacacctt 360
 cggcctgcag ctggagctca ccgagggtat gcgcttcgac aagggtaca tctcgggtta 420
 cttcgtgacc gacgccgagc gtcaggaagc cgtcctggag gatccctaca tcctgctggt 480
 cagctccaag gtctcgaccg tcaaggacct gtcgccgtg ctggagaagg tcatccagtc 540
 cggcaagccg ctgctgatca tgcgcgagga cgtcgagggc gaagccctgt ccaccctggt 600 ggtc
 604 <210> 16 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium fortuitum 49404 <
 400> 16 ggaggacccg tacgagaaga tcggcgcaaga gctggtcaag gaagtcgcca agaagactga
 60 cgacgtcgca ggcgacggca ccaccacggc caccgtgctc gcccaggctc tggttcgca 120
 aggtctgcgc aacgtcgag ccggcgccaa cccgctcggc ctgaagcgcg gcatcgagaa 180
 ggctgtcggg gccgtcacc agacgtgct gaagtcgcc aaggaggtgg agaccaagga 240
 gcagatcgct gccaccgccg cgatctccgc cggtagcgtc cagatcggcg agtcatcgc 300
 cgaggccatg gacaaggtcg gcaacgaggg tgtcatcacc gtcgaggagt cgaacacctt 360
 cggcctgcag ctggagctca ccgagggtat gcgcttcgac aagggtaca tctcgggtta 420
 cttcgtgacc gacgccgagc gtcaggaagc ggtcctcgag gatccgtaca tcctgctcgt 480

ctcgtcgaag gtctcgacgg tcaaggacct gctgcccctg ctggagaagg tcatccaggc 540

cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaagccctgt ccaccctggt 600 ggtc

604 <210> 17 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium gastris <400> 17

ggaggacccg tacgagaaga tcggcgccga gctgggtcaag gaagtcgcca agaagaccga 60

cgacgtcgcc ggcgacggca ccaccacggc caccgtgctc gcgcaggcgc tgggtcaagga 120

gggcctgcgc aacgtcgcg cggcgccaa cccgctgggc ctgaagcgcg gcatcgagaa 180

ggccgtcgag aaggtcaccg agacgtgct caagggcgcc aaggaggtcg agaccaagga 240

gcagatcgcg gccaccgagg ccattctccgc cgggtgaccag tcgatcggcg acctgatcgc 300

cgaggcgatg gacaaggtgg gcaacgaggg tgcattcacc gtcgaggagt ccaacacctt 360

cggcctgcag ctcgagctca ccgagggtat gcggttcgac aagggtctaca tctccggcta 420

cttcgtcacc gacgtgagc gtcaggaagc tgttctggag gaccctaca tcttctggt 480

cagctcgaag gtctcgaccg tcaaggacct gctgccgctg ttggagaagg tcatccaggc 540

gggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaggcgctgt ccaccctggt 600 cgtc

604 <210> 18 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium genavense <400>

18 ggaggacccc tacgagaaga tcggcgctga gctgggtcaag gaagtcgcca agaagaccga 60

cgacgtcgcc ggtgacggca ccacgacggc caccgtgctc gtcaggcgc tcttcaagga 120

gggcctgcgc aacgtggcgg cggcgccaa cccgctgggc ctcaagcgcg gcatcgagaa 180

ggccgtcgaa aaggtcaccg agacgtgct gaagtcggcc aaggatgtcg agaccaagga 240

ccagatcgct gccaccgccc cgatttccgc gggcgaccag tcgatcggcg acctgatcgc 300

cgaggcgatg gacaaggtcg gcaacgaggg cgtcattcacc gtcgaggagt ccaacacctt 360

cgggctgcag ctcgagctca ccgagggtat gcggttcgac aagggtctaca tctcgggcta 420

ctctgtcacc gacgccgagc gtcaggaagc cgtcctggag gacccttca tcctgctggt 480
 cagctccaag gtgtcgacgg tcaaggacct gctgccgctg ctggagaagg tcatccaggc 540
 cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaggcgctga gcaccctggt 600 cgtc
 604 <210> 19 <211> 603 <212> DNA <213> Mycobacterium gordonae <400>
 19 gaggacccgt acgagaagat cggcgctgag ctggtcaagg aagtcgcaa gaagaccgac 60
 gacgttgccg gcgacggcac gacgacggcg accgtgctgg cgcaggcact ggtcaaggaa 120
 ggcttgcgca acgtagccgc cggcgccaac ccgctggggc tgaagcgcg catcgagaag 180
 gccgtggaga aggtcaccca gaccctgctc agctcggcca aggacgtcga gaccaaggag 240
 cagatcgcg ccaccgcggg catctccgcg ggtgaccagt cgatcggtag cctgatcgcc 300
 gaggcgatgg acaaggtcgg caacgagggc gtcattcaccg tcgaggagtc caacaccttc 360
 ggcttgcagc tcgagctgac cgagggcatg cggttcgaca agggctacat ctcggtctac 420
 ttctgtaccg acgccgagcg tcaggaagcc gtcctggaag accctacat cctgctggtg 480
 tccagcaagg tgtcgacct gaaggacctg ctgccgctgc tggagaaggt cattcagggt 540
 ggcaagccgc tgctgatcat cgccgaggac gtcgagggcg aagcgctgtc gaccctggtc 600 gtc
 603 <210> 20 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium haemophilum <400>
 20 ggaggacccg tacgagaaga tcggcgccga gctggtcaag gaagtcgcca agaagaccga 60
 cgacgtcgct ggtgatggca ccacgacggc gacggtgctg gctcaggcgc tggtaaaga 120
 gggcctgcgt aacgtcgcg ccggcgccaa cccgctgggt ctcaagcgcg gcatcgagaa 180
 ggcggtcgag aagatcaccg agacgtgct caagggcgcc aaggaggtcg agaccaagga 240
 ccaaattgcg gccaccgag cgatctcggc gggtagaccg tcgatcggcg acctgatcgc 300
 cgaggcgatg gacaaggtcg gcaacgaggg cgtcatcacc gtcgaggagt ccaacacctt 360

cggcctgcag ctcgagctca ccgagggcat gcggttcgat aagggtctaca tctcgggcta 420
 cticgtcacc gacgccgagc gccaggaagc cgtcctggag gacccttaca tcctgctggt 480
 cagctccaag gtgtcgaccg tcaaggacct gctgccactg ttggagaagg tcatccaggc 540
 cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaggcgctgt ccaccctggt 600 cgtc
 604 <210> 21 <211> 603 <212> DNA <213> Mycobacterium interjectum <400>
 21 gaggaccctg acgagaagat cggcgccgag ctggtcaagg aagtcgcaa gaagaccgac 60
 gacgtcgccg gtgacggcac gacgacggcc acggtgctgg cccaggccct ggtcaaggag 120
 ggcttgcgca acgtcgggc cggcgccaac ccgccggcgc tcaagcgagg catcgaaaag 180
 gccgtcgaga aggtcaccga gaccctgctg aagtcggcca aggatgtcga gaccaaggag 240
 cagatcgccg cgaccgccgc gatctccgcg ggcgaccagt cgatcggcga cctcatcgcc 300
 gaggcgatgg acaaggtcgg caacgagggc gtcacaccg tcgaggagtc caacaccttc 360
 ggcttgcagc tcgagctcac cgagggcatg cggttcgaca agggctacat ctcgggctac 420
 ttcttcaccg acgccgagcg tcaggaagcg gtcctcgagg acccctacat cctgctggtc 480
 agctcgaagg tgtcgacggt caaggacctg ttgccgctgc tggagaaggc catccaggcc 540
 ggcgagccgc tgttgatcat cgccgaggac gtcgagggcg aggcgctgtc caccctggtc 600 gtc
 603 <210> 22 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium intermedium <400>
 22 ggaggaccgc tacgagaaga tcggcgccga gctggtcaag gaagttgcca agaagacgga 60
 cgacgtcgcc ggtgacggca ccacgacggc caccgtgctc gccaggcgc tggctgcgca 120
 gggcttgcgc aatgtcgctg ccggtgcca cccgctgagc ctgaagcgcg gtatcgagaa 180
 ggcagtgcag aaggtcaccg agaccctgct caagtcggcc aaggaggctg agaccaagga 240
 ccagatcgct gccaccgcag cgatttccgc gggggaccag tcgatcggcg acctgatcgc 300

cgaggcgatg gacaaggtcg gcaacgaggg tgtcatcacc gtcgaggagt ccaacacctt 360
 cggcctgcag cttagactca ccgaggggtat gcggttcgac aagggttaca tctcgggcta 420
 cttcgtcacc gacgccgagc gtcaggaagc cgtcctggaa gacccttaca tcctgctggt 480
 cagctccaag gtttcgacgg tcaaggacct gtcctcgctg ctggagaagg tcattcaggc 540
 cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaggcgctga gcaccttggt 600 cgtc
 604 <210> 23 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium intracellulare
 <400> 23 ggaggacccg tacgagaaga tcggcgccga gctggtcaag gaagtcgcca agaagaccga
 60 cgacgtcgcc ggtgacggca cgacgacggc cacggtgctg gtcaggcgt tggtccgcga 120
 gggcctgcgt aacgtcgccg ccggcgccaa cccgctgggt ctcaagcgcg gcatcgagaa 180
 ggccgtcgag aaggtcaccg agaccctgct caagtcggcc aaggaggtcg agaccaagga 240
 ccagatcgct gccaccgcgg cgatttcggc gggcgaccag tcgatcggtg acctcatcgc 300
 cgaggggatg gacaaggtcg gcaacgaggg cgtcatcacc gtcgaggagt ccaacacctt 360
 cggcctgcag cttagactca ccgagggcat gcggttcgac aagggttaca tctcgggcta 420
 cttcgtcacc gacgccgagc gtcaggaagc ggtcctcgag gacccttca tcctgctggt 480
 cagctccaag gtgtcgacgg tcaaggacct gtcctcgctg ctggagaagg tcattcaggc 540
 cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaggcctctga gcaccttggt 600 cgtc
 604 <210> 24 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium kansasii Type I
 <400> 24 ggaggacccg tacgagaaga tcggcgccga gctggtcaag gaagtcgcca agaagaccga
 60 cgacgtcgct ggcgacggca ccaccacggc caccgtgctt ggcaggcgc tggtcaaaga 120
 gggcctgcgc aacgtcgccg ccggcgccaa cccgctgggc ctcaagcgcg gcatcgagaa 180
 ggccgtcgag aaggtcaccg agacgtgct caagggcgcc aaggaggtcg agaccaagga 240

gcagatcgcg gcgaccgcgg ccatctccgc cggcgaccag tcgatcggcg acctgatcgc 300
 cgaggcgatg gacaaggtcg gcaacgaggg tgtcatcacc gtcgaggagt ccaacacctt 360
 cggcctgcaa ctcgagctca ccgagggcat gcggttcgac aagggttaca tctccggcta 420
 cticgtcacc gacgccgagc gtcaggaagc ggttctggag gaccctaca tcctgctggt 480
 cagctcgaag gtatcgacgg tcaaggacct gctgccgctg ctggagaagg tcatccaggc 540
 cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaggcgctgt ccaccctggt 600 cgtc

604 <210> 25 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobaterium kansasii Type II <

400> 25 ggaggacccg tacgagaaga tcggcgccga gctggtaag gaagtcgcca agaagaccga
 60 cgacgtcgcc ggcgacggca ccaccacggc cactgtgctc gcgcaggcgt tggtaaaaga 120

gggcctgcgc aacgtcgcg cggcgccaa cccactgggc ctgaagcgcg gcatcgagaa 180

ggcagtcgag aaggtcaccg agacgtgct caagggcgcc aaggaggtcg agaccaagga 240

gcagatcgct gccaccgcgg ccatctccgc gggtgaccag tcgatcggcg acctgatcgc 300

cgaggcgatg gacaaggtgg gcaacgaggg tgtcatcacc gtcgaggagt ccaacacctt 360

cggcctgcag ctcgagctca ccgagggat gcggttcgac aagggttaca tctccggcta 420

cticgtcacc gacgccgagc gtcaggaagc agttctggag gaccctaca tcctgctggt 480

cagctccaag gtgtccaccg tcaaggacct gctgccgctg ctggagaagg tcatccaggc 540

cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaggcgctgt ccaccctggt 600 cgtc

604 <210> 26 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobaterium kansasii Type III <

400> 26 ggaggacccg tacgagaaga tcggcgccga gctggtaag gaagtcgcca agaagaccga

60 cgacgtcgcc ggcgacggca ccaccacggc cactgtgctc gcgcaggcgc tcgtcaagga 120

gggcctgcgc aacgtggcgg cggcgccaa cccgtgggc ctgaagcgcg gcatcgagaa 180

ggccgtcgag aaggtcaccg agaccttggt caagggtgcc aaggaggtcg agaccaagga 240
gcagatcgcg gccaccgcgg ccatctcggc cggtgaccag tcgattggcg acctgatcgc 300
cgaggcgatg gacaaggtag gcaacgaggg tgtcatcacc gtcgaggagt ccaacacctt 360
aggcctgcag ctcgagctca ccgagggtat gcgctttgac aagggttaca tctccggcta 420
cttcgtcacc gacgccgagc gtcaggaagc agtgctggaa gacccttaca tcctgttggt 480
cagctccaag gtgtcgacgg tcaaggacct gctgccgctg ctggagaagg tcatccaggc 540
cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggt gaggctttga gcaccttggt 600 cgtg

604 <210> 27 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium leprae <400> 27

ggaggacccg tacgagaaga ttggcgctga gttggtcaag gaagtcgcca agaagacaga 60
tgacgtcgcc ggtgatggca ccacgacggc caccgtgctg gcccaggcat tggtaaaga 120
gggcctacgc aacgtcgcg ccggcgccaa cccgctaggt ctcaagcgtg gcatcgagaa 180
agctgtcgat aaggtaactg agactctgct caaggacgct aaggaggtcg aaaccaagga 240
acaaattgct gccactgcag cgatttcggc gggtgaccag tcgatcggtg atctgatcgc 300
cgaggcgatg gacaaggttg gcaacgaggg tgttatcacc gtcgaggaat ccaacacctt 360
cggctctgcag ctcgagctca ccgagggaat gcggttcgac aagggttaca tttcgggcta 420
cttcgtcacc gacgccgagc gtcaggaagc tgtcctagag gagccctaca tccttctggt 480
cagctccaaa gtgtctaccg tcaaggacct gctgccgctg ctagagaagg tcatccaggc 540
cggcaagtcg ctgctgatca ttgctgagga tgtcgagggt gaggcgttgt ctaccctggt 600 cgtc

604 <210> 28 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium malmoense <400>

28 ggaggacccg tacgagaaga tcggcgccga gctggtcaag gaagtcgcca agaagaccga 60
cgacgtggcc ggtgacggca cgacgacggc caccgtgctg gcgcaggcgc tggtaaaga 120

gggcctgcgc aacgtcgcgg ccggtgccaa cccgctcagc ctcaagcgcg gcatcgagaa 180
 ggcggtcgag aaggtcaccg agaccctgct caagtcggcc aaggaggtcg agaccaagga 240
 gcagatcgcc gcgaccgccg cgatctcggc gggcgaccag tcgatcgggtg acctgatcgc 300
 cgaggcgatg gacaaggtcg gcaacgaggg cgtcctcacc gtcgaggagt ccaacacctt 360
 cggcctgcag ctcgagctca ccgagggcat gcggttcgac aagggtctaca tctcgggcta 420
 ctctgtcacc gaccccgagc gtcaggaagc ggtcctggag gaccctaca tcctgctggt 480
 cagctccaag gtgtcgacgg tcaaggacct gctgccgctg ctggagaagg tcattcaggc 540
 cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaggcgctct ccaccctggt 600 cgtc

604 <210> 29 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium marinum <400>

29 ggaggacccg tacgagaaga tcggcgctga gctgggtcaag gaagttgcc aagaagaccga 60
 cgacgtggcc ggtgacggca cgacgacggc caccgtgctg gccagggcg tggtcaagga 120
 aggcctgcgc aacgttgcgg ccggtgccaa cccgctcgggt ctgaagcgcg gcatcgagaa 180
 ggcatcgag aaggtcaccg agacctgct caagtcggcc aaagaggtcg agaccaagga 240
 gcagatcgcg gcgaccgcag ccatctccgc cggcgaccag tcgatcggcg acctgatcgc 300
 cgaggcgatg gacaaggtgg gcaacgaggg cgtcatcacc gtcgaggagt ccaacacctt 360
 cggcctgcag ctcgagctca ccgaggggat gcggttcgac aagggtctaca tctcgggcta 420
 ctctgtcacc gacgccgagc gtcaggaagc ggtcctggag gaccctaca tcctgctggt 480
 cagttccaag gtgtccaccg tgaaggacct gctgccgctg ctggagaagg tcattcaggg 540
 cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaggcgctgt ccaccctggt 600 cgtc

604 <210> 30 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium mucogenicum <400>

30 ggaggacccg tacgagaaga tcggcgctga gctgggtcaag gaagttgcc aagaagaccga 60

cgacgtcgct ggcgacggca ccaccaccgc caccgtgctg gcccaggccc tggttcgca 120
 aggcctgcgc aacgtcgctg ccggcgccaa cccgctcggc ctgaagcgcg gcatcgagaa 180
 ggccgtcgag gctgtcacca agggcctgct ggcttccgcc aaggaggtcg agaccaagga 240
 gcagatcgct gccaccgcgc ggatctcggc cggtgaccag tccatcggcg acctgatcgc 300
 cgaggccatg gacaaggtcg gcaacgaggg tgtcatcacc gtcgaggaga gcaacacctt 360
 cggcctgcag ctggagctca ccgagggtat gcgcttcgac aagggttaca tctcgggtta 420
 cttcgtgacc gacgccgagc gtcaggaagc ggtcctcgag gacccttca tctgtctggt 480
 cagctcgaag atctcgaccg tcaaggacct gctgccgctg ctggagaagg tcatccagtc 540
 gggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaagccctgt cgaccctggt 600 cgtc

604 <210> 31 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium neoaurum <400>

31 ggaggaccgc tacgagaaga tcggcgccga gctggtcaaa gaggtcgcca agaagaccga 60
 tgacgtcgcg ggcgacggca ccaccaccgc caccgtgctg gcccaggccc tggttcgca 120
 aggtctgcgc aacgtcgcg ccggcgccaa cccctcggc ctgaagcgcg gcatcgagaa 180
 ggccgtcgcg gccgtcaccg agcgctgct ctcgaccgcc aaagaggtcg agaccaagga 240
 gcagatcgct gccaccgcgc gcatctccgc cggtgaccag tcgatcgggtg acctgatcgc 300
 cgaggcgctg gacaaggtcg gcaacgaggg tgtcatcacc gtcgaggagt ccaacacctt 360
 cggcctgcag ctggagctca ccgagggtat gcgcttcgac aagggttaca tctcgggtta 420
 cttcgtgacc gacgccgagc gtcaggaagc cgtcctggag gatccctaca tctgtctggt 480
 cagctccaag gtctcgaccg tcaaggacct gctgccgctg ctggagaagg tcatccagtc 540
 cggcaagccg ttgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaagccctgt cgaccctggt 600 ggtc

604 <210> 32 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium nonchromogenicum <

400> 32 ggaggatccc tacgagaaga tcggcgctga gctgggtcaaa gaggtcgcca agaagactga
60 cgacgtcgcg ggtgacggca ccaccaccgc caccgtgctc gcccaggccc tggtaagga 120
aggcctgcgc aacgtggccg ccggcgccaa cccgctgggt ctgaagcgcg gcatcgagaa 180
ggccgttgag aaggtcacct cgaccctgct ggcttcggcc aaggaggtcg agaccaagga 240
gcagatcgcg gccaccgccc gtatctccgc gggtgaccag agcatcgggt acctgatcgc 300
cgaggccatg gacaaggtcg gcaacgaagg tgtcatcacc gtcgaggagt ccaacacctt 360
cggcctgcag ctggagctca ccgagggcat gcgcttcgac aagggttaca tctcgggtta 420
cttcgtgacc gacgccgagc gtcaggaagc cgtcctggag gaccctaca tctgctggt 480
cagctcgaag atctcgaccg tcaaggacct gctgcccttg ctggagaagg tcatccagtc 540
cggcaagccg ttgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaggccctgt cgaccctggt 600 cgtg
604 <210> 33 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobaterium paratuberculosis <
400> 33 ggaggacccg tacgagaaga tcggcgccga gctgggtcaag gaagtcgcca agaagaccga
60 cgacgtcgcc ggtgacggca cgacgacggc caccgtgctc gcccaggcgt tggtaagga 120
gggcctgcgc aacgtcgcg ccggcgccaa cccgctgggt ctcaagcgcg gcatcgagaa 180
ggccgtcgag aaggtcaccg agaccctgct caagtcggcc aaggaggtcg agaccaagga 240
ccagatcgct gccaccgccc ccatctccgc gggcgaccag tcgatcggcg acctgatcgc 300
cgaggcgatg gacaaggtcg gcaacgaggg cgtcatcacc gtcgaggagt ccaacacctt 360
cggcctgcag ctcgagctca ccgaggggtat gcggttcgac aagggttaca tctcgggcta 420
cttcgtcacg gacgccgagc gtcaggaagc ggtcctcgag gaccgttca tctgctggt 480
cagctccaag gtctcgaccg tcaaggacct gctgccgtg ctggagaagg tcatccaggc 540
cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaggccctgt ccaccctggt 600 cgtc

604 <210> 34 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobaterium phlei <400> 34

cgaggatccg tacgagaaga tcggcgccga gctggtcaaa gaggtcgcca agaagaccga 60

cgatgtcgcg ggtgacggca ccaccaccgc caccgtcctg gcccaggcgc tgggtcgcgca 120

gggtctgcgc aacgttgccg ccggcgccaa cccgatggct ctgaagcgcg gtatcgagaa 180

ggccgtcgag aaggtcaccg agaccctgct gaagtcggcc aaggaggtcg agaccaagga 240

gcagatcgct tcgaccgccg cgatctcggc cggcgacacc cagatcggcg agctgatcgc 300

cgaggccatg gacaaggtcg gcaacgaggg tgtcatcacc gtcgaggaga gcaacacctt 360

cggcctgcag ctggagctca ccgagggtat gcgcttcgac aagggtctaca tctcgggtta 420

cttcgtgacc gacgccgagc gtcaggaagc cgtcctcgag gatccgtaca tcctgctggt 480

gtcgggcaag gtctcgaccg tcaaggacct gctgccgctg ctggagaagg tcatccagtc 540

gggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaggccctgt cgaccctggt 600 cgtg

604 <210> 35 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium peregrinum <400>

35 ggaggaccg tacgagaaga tcggcgctga gctggtcaaa gaggtcgcca agaagaccga 60

cgacgtcgcg ggtgacggca ccaccaccgc caccgttctg gcccaggccc tggttcgcgca 120

aggtctgcgc aacgtcgctg ccggcgccaa cccgctcggc ctgaagcgcg gcatcgagaa 180

ggctgtcgag aaggtcaccg agaccctcct gaagtcggcc aaggaggtgg agaccaagga 240

gcagatcgct gccaccgccg gtatctccgc cggagaccag tccatcggcg acctgatcgc 300

cgaggccatg gacaaggtcg gcaacgaggg tgtcatcacc gtcgaggaga gcaacacctt 360

cgggctgcag ctggagctca ccgagggtat gcgcttcgac aagggtctaca tctcgggtta 420

cttcgtgacc gacgccgagc gtcaggaagc cgtcctggag gatccctaca tcctgctggt 480

cagctcgaag atctcgaccg tcaaggacct gctgccgctg ctggagaagg tcatccagtc 540

cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaagccctgt cgaccctggt 600 ggtc
 604 <210> 36 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium scrofulaceum <400>
 36 ggaggaccg tacgagaaga tcggcgccga gctgggtcaag gaagtcgcca agaagaccga 60
 cgacgtcgcc ggtgacggca cgacgacggc cacggtgctg gcccaggcgc tgggtcaagga 120
 gggcctgcgc aacgtcgcg cgggcgccaa cccgctgagc ctcaagcgcg gcatcgagaa 180
 ggcggtcgag aaggtcaccg agaccctgct caagtcggcc aaggaggctg agaccaagga 240
 ccagatcgcc gccaccgcg cgatttcggc gggcgaccag tcgatcggcg acctgatcg 300
 cgaggcgatg gacaaggctg gcaacgaggg cgtcatcacc gtcgaggagt ccaacacctt 360
 cggcctgcag ctcgagctca ccgagggcat gcggttcgac aagggttaca tctcgggcta 420
 cttcgtcacc gacgccgagc ggcaggaagc ggtcctggag gaccctaca tcctgctggt 480
 cagctcgaag gtgtcgacgg tcaaggacct gctgccgctg ttggagaagg tcatccaggc 540
 cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaggcgcttt ccaccctggt 600 cgtc
 604 <210> 37 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium senegalense <400>
 37 ggaggaccg tacgagaaga tcggcgctga gctgggtcaag gaagtcgcca agaagactga 60
 cgacgtcgcg ggtgacggca ccaccaccgc caccgttctg gcccaggccc tgggtcgtga 120
 aggtctgcgt aacgtcgctg ccggcgccaa cccgctcggc ctgaagcgcg gcatcgagaa 180
 ggccgtcgag aaggtcaccg agacgtgct caagagcgcc aaggagggtg agaccaagga 240
 gcagatcgct gccaccgccg cgatctcggc gggcgacacc cagatcgga agctgatcg 300
 cgaggccatg gacaaggctg gcaacgaggg tgtcatcacc gttgaggagt ccaacacctt 360
 cgggctgcag ctcgagctca ccgagggat gcggttcgac aagggttaca tctcgggtta 420
 cttcgtgacc gacgccgagc gtcaggaagc ggtcctcgag gatccctgca tcctgctcgt 480

gtcgtccaag gtgtcgaccg tcaaggatct gctcccgttg ctggagaagg tcattcaggc 540
 cggcaagccg gtgtgatca tcgccgagga cgtcgagggt gaggccctgt cgaccctggt 600 ggtc
 604 <210> . 38 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium shimoidei <400>
 38 ggaggacccg tacgagaaga tcggcgccga gctgggtcaag gaagtcgcca agaagaccga 60
 cgacgtcgcc ggtgacggca ccaccaccgc caccgtgctg gcccaggcgc tgggtccacga 120
 ggggctgcgc aacgtcgcg cgggtgccaa cccgctcagc ctgaaacgcg gtatcgagaa 180
 ggccgttgag aaggtcaccg agaccttgct caagggcgcc aaggaagtcg agaccaagga 240
 gcagatcgcg gccacggcgg ccattctccg cggtgaccag tcgatcggcg acctgatcg 300
 cgaggcgatg gacaaggtcg gcaacgaggg cgtcatcacc gtcgaggagt ccaacacctt 360
 cggcctgcag ctcgagctca ccgagggtat gcggttcgac aagggttaca tttcgggtta 420
 cttcgtcacc gacgccgagc gtcaggaggg tgtgctcgag gagccctaca tctgctggt 480
 cagctccaag gtgtcgaccg tcaaggacct gctgccgctg ctggagaagg tcatgcaggc 540
 cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaggctttga gcaccctggt 600 cgtc
 604 <210> 39 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium simiae <400> 39
 ggaggacccc tacgagaaga tcggcgctga gctgggtcaag gaagtcgcca agaagaccga 60
 cgacgtcgcc ggtgacggca ccacgacggc caccgtgctc gtcaggcgc tcgtcaagga 120
 gggcctgcgc aacgtggcgg ccggcgccaa cccgctgggc ctcaagcgcg gcatcgagaa 180
 ggccgtcgaa aaggtcaccg agacgtgct gaagtcggcc aaggatgtcg agaccaagga 240
 ccagatcgct gccaccgccg cgatttccgc gggcgaccag tcgatcggcg acctgatcg 300
 cgaggcgatg gacaaggtcg gcaacgaggg cgtcatcacc gtcgaggagt ccaacacctt 360
 cgggctgcag ctcgagctca ccgagggtat gcggttcgac aagggttaca tctcgggcta 420

cttcgtcacc gacgccgagc gtcaggaagc cgtcctggag gacccgttca tcctgctggt 480
 cagctccaag gtgtcgacgg tcaaggacct gctgccgctg ctggagaagg tcatccaggc 540
 cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaggcgctga gcaccctggt 600 cgtc
 604 <210> 40 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium smegmatis <400>
 40 cgaggacccc tacgagaaga tcggtgctga gctcgtcaaa gaggtcgcca agaagaccga 60
 cgatgtcgct ggcgacggca ccaccaccgc caccgtcctg gtcaggccc tggttcgca 120
 aggcctgcgc aacgtcgctg ccggcgccaa cccgtcggc ctgaagcgcg gcatcgagaa 180
 ggccgtcgag aaggtcaccg agaccctgct gaagtccgcc aaggaggtgg agaccaagga 240
 gcagatcgct gccaccgccg gtatctccgc cggtgaccag tccatcggcg acctgatcgc 300
 cgaggccatg gacaaggtcg gcaacgaggg tgtcatcacc gtcgaggagt ccaacacctt 360
 cggcctgcag ctcgagctca ccgagggtat gcgcttcgac aagggtaca tctcgggtta 420
 cttcgtgacc gacgccgagc gtcaggaagc ggtcctcgag gatccctaca tcctgctggt 480
 cagctcgaag gtctcgaccg tcaaggacct gctgccgctg ctggagaagg tcatccagtc 540
 cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaagccctgt cgaccctggt 600 ggtc
 604 <210> 41 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium szulgai <400>
 41 ggaggacccg tacgagaaga tcggcgccga gctggtcaag gaagttgcca agaagaccga 60
 cgacgtcgcc ggtgacggca cgacgacggc caccgtgttg gccaggcgc tggtaagga 120
 gggcctgcgc aacgtagcgg ccggcgccaa cccgtcgggt ctcaagcgcg gcatcgagaa 180
 ggccgtcgag aagatcaccg agaccctgct caagtcggct aaggacgtcg agaccaagga 240
 gcagatcgcg gccaccgccg ccatctccgc gggcgaccag tcgatcggcg acttgatcgc 300
 cgaggcgatg gacaaggtcg gcaatgaggg cgtcatcacc gtcgaggagt ccaacacctt 360

cggcctgcag ctcgagctca ccgaggcat gcggttcgac aagggtaca tctcgggcta 420
 ctctgcacc gacgccgagc gtcaggagc cgctctcgag gacccttaca tcctgttggt 480
 cgcctccaag gtgtcgacgg tcaaggacct gttgccgctg ctggagaagg tcatccaggg 540
 cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgctcagggc gaggctttga gcaccctggt 600 cgtc
 604 <210> 42 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium terrae <400> 42
 ggaggacccc tacgagaaga tcggcgccga gctgggtcaaa gaggtcgcca agaagaccga 60
 cgatgtcgcc ggtgacggca ccaccacggc caccgtgctg gcacaggcgc tgggtcaagga 120
 aggcctgcgc aacgtggccg ccggcgccaa cccgctggcc ctgaagcgcg gcatcgagaa 180
 ggccgtcgag aaggtctccg agaccctgct gaaggacgcc aaggaggtcg agaccaagga 240
 gcagatcgcg gctaccgccg ggatctccgc gggcgaccag tccatcggtg acctgatcg 300
 cgaggcgatg gacaaggtcg gcaacgaggg tgtcatcacc gtcgaggagt ccaacacctt 360
 cggcctgcag ctggagctca ccgagggtat gcgcttcgac aagggtaca tctcgggtta 420
 ctctgcacc gacgccgacc gtcaggaagc ggttctcgag gacccttaca tcctgttggt 480
 cagctccaag atctcgacgg tcaaggacct gtcacctg ctggagaagg tcattcaggg 540
 cggttaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgctcagggc gaggccctgt ccaccctggt 600 ggct
 604 <210> 43 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium thermoresistibile
 <400> 43 ggaggacccc tacgagaaga tcggcgctga gctgggtcaag gaagtcgcca agaagaccga
 60 cgacgtcgcc ggcgacggca ccaccaccgc caccgtcctg gtcaggcgc tgggtgaagga 120
 aggtttgcgc aacgtcgcg ccggggccaa cccgctcgct ctgaagcgcg gcatcggagc 180
 cgctgtcgag aaggtcaccg agaccctgct caagtcggcc aaggaggtcg agaccaagga 240
 gcagatcgcc aacaccgccg cgatctcggc cggcgaccag cagaccggtg agctgatcg 300

cgaggcgatg gacaaggctg gcaacgaggg tgtcatcacc gtcgaggagt cgcagacctt 360
 cggtctgcag ctcgagctca ccgagggtat gcgcttcgac aagggtctaca tctcggggta 420
 ctctgtgacc gacgcggagc ggcaggaagc cgttctggag gatccctaca tcctgtgtgt 480
 cagctcgaag gtctcgactg tcaaggatct gctgccgctg ctggagaagg tcatccagtc 540
 cggcaggccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgaaggc gaggcgctgt cgaccctggt 600 cgtc
 604 <210> 44 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium triviale <400>
 44 ggaggacccg tacgagaaga tcggcgccga gctgggtcaag gaagtcgcca agaagaccga 60
 cgatgtgcc ggtgacggca ccaccacggc caccgtgctc gcccaggcgc tgggtgcgca 120
 gggcctgcgc aacgtcgccg cgggcgccaa cccgatgggc ctgaagcgcg gcatcgaggc 180
 ggccaccgag aagatcgccg agaccctgct caagggcgcc aaagaggtgg agaccaagga 240
 gcagatcgct gccaccgccc ggatctccgc cggggacagc tccatcggtg agctgatcgc 300
 cgaggcgatg gacaaggctg gcaacgaggg tgtcatcacc gtcgaggagg cccagacctt 360
 cggcctgcag ctcgagctca ccgagggtat gcgcttcgac aagggtctaca tctccggcta 420
 ctctgtcacc gacgccgagc gtcaggaggc cgtgctggag gacccttaca tcctgtgtgt 480
 gtccggcaag gtgtccaccg tcaaggacct gcttccgctg ctggagaagg tcatccagtc 540
 cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgaaggc gaggcgctgt cgaccctggt 600 ggtc
 604 <210> 45 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium tuberculosis <400>
 45 ggaggatccg tacgagaaga tcggcgccga gctgggtcaaa gaggtagcca agaagaccga 60
 tgacgtgcc ggtgacggca ccacgacggc caccgtgctg gcccaggcgt tggttcgca 120
 gggcctgcgc aacgtcgccg cgggcgccaa cccgctcggt ctcaaacgcg gcatcgaaaa 180
 ggccgtggag aaggtcaccg agaccctgct caagggcgcc aaggaggtcg agaccaagga 240

gcagattgcg gccaccgcag cgatttcggc gggtagaccag tccatcggtg acctgatcgc 300
 cgaggcgatg gacaaggtgg gcaacgaggg cgtcatcacc gtcgaggagt ccaacacctt 360
 tgggctgcag ctcgagctca ccgaggggtat gcggttcgac aagggtctaca tctcggggta 420
 ctctgtgacc gacccggagc gtcaggaggc ggtcctggag gacccttaca tcctgtctgt 480
 cagctccaag gtgtccactg tcaaggatct gctgccgctg ctcgagaagg tcatcgagc 540
 cggtaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaggcgctgt ccaccttgt 600 cgtc

604 <210> 46 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium ulcerans <400>

46 ggaggacccg tacgagaaga ttggcgctga gctgggtcaag gaagttgcca agaagaccga 60

cgacgtggcc ggtgacggca cgacgacggc caccgtgctg gccagggcg tggtcaagga 120

aggcctgcgc aacgttgcgg ccggtgcca cccgctcggt ctgaagcgcg gcatcgagaa 180

ggcagtcgag aaggtcaccg agaccctgct caaatcggcc aaagaggtcg agaccaagga 240

gcagatcgcg gcgaccgcag ccattctccg cggcgaccag tcgatcggcg acctgatcgc 300

cgaggcgatg gacaaggtgg gcaacgaggg cgtcatcacc gtcgaggagt ccaacacctt 360

cggcctgcag ctcgagctca ccgaggggat gcggttcgac aagggtctaca tctcgggcta 420

cttctgcacc gacgccgagc gtcaggaagc ggtcctggag gacccttaca tcctgtctgt 480

cagctccaag gtgtccaccg tcaaggacct gctgccgctg ctggagaagg tcattcaggg 540

cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaggcgctgt ccaccttgt 600 cgtc

604 <210> 47 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium vaccae <400> 47

ggaggacccg tacgagaaga tcggcgctga gctgggtcaaa gaggtcgcca agaagaccga 60

cgacgtcgcg ggcgacggta ccaccaccgc caccgtgctc gtcaggctc tggttcgcga 120

aggcctgcgc aacgtcgag ccggcgccaa cccgctcggc ctcaagcgtg gcatcgagaa 180

ggctgtcgag gctgtcacc agtcgtgct gaagtcggcc aaggaggtcg agaccaagga 240
 gcagatttct gccaccgcgg cgatctccgc cggcgacacc cagatcggcg agtcacgcg 300
 cgaggccatg gacaaggtcg gcaacgaggg tgtcatcacc gtcgaggagt cgaacacctt 360
 cggcctgcag ctcgagctca ccgagggtat gcgcttcgac aagggtaca tctcgggtta 420
 cttcgtgacc gacgccgagc gccaggaagc cgtcctggag gatccctaca tcctgctggt 480
 cagctccaag gtgtcgaccg tcaaggatct gctcccgctg ctggagaagg tcatccaggc 540
 cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaggccctgt ccacgtggt 600 ggtc
 604 <210> 48 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium wolinskyi <400>
 48 ggaggacccg tacgagaaga tcggcgctga gctggtcaaa gaggtcgcca agaagaccga 60
 cgacgtcgcc ggcgacggca ccaccaccgc caccgttttg gccaggctc tggttcgca 120
 aggtctgcgc aacgtcgcg ccggcgccaa cccgctcggc ctgaagcgcg gcatcgagaa 180
 ggccgtcgag aaggtcaccg agacgtgct gaagagcgcc aaggaggtgg agaccaagga 240
 gcagatcgct gccaccgccg gtatctccgc cggtgaccag tccatcggcg acctgatcg 300
 cgaggccatg gacaaggtcg gcaacgaggg tgtcatcacc gtcgaggaga gcaacacctt 360
 cggcctgcag ctggagctca ccgagggtat gcgcttcgac aagggtaca tctcgggtta 420
 cttcgtgacc gacgccgagc gtcaggaagc cgtcctcgag gatccctaca tcctgctggt 480
 cagctcgaag gcctcgaccg tcaaggacct gctgccgctg ctggagaagg tcatccagtc 540
 cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaggccctgt cgaccctggt 600 ggtc
 604 <210> 49 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium parafortuitum
 <400> 49 ggaggacccg tacgagaaga tcggcgctga gctggtcaaa gaggtcgcca agaagaccga
 60 cgacgtcgcg ggcgacggca ccaccaccgc caccgtgctc gtcaggccc tggttcgca 120

aggtctgcgc aacgtcgag ccggcgccaa cccgctcggc ctcaagcgtg gcatcgagaa 180
 ggctgtcgag gctgtcacc agggtctgct gaagtcggcc aaggaggtcg agaccaagga 240
 gcagatcgct gccaccgccg cgatctccgc cggcgacacc cagatcggcg agctcatcgc 300
 cgaggccatg gacaaggtcg gcaacgaggg tgtcatcacc gtcgaggagt cgaacacctt 360
 cggcctgcag ctggagctca ccgaaggcat gcgcttcgac aagggttaca tctcgggtta 420
 ctctgtgacc gacgccgagc gtcaggaagc cgtcctggag gatccctaca ttctgtgtgt 480
 cagctccaag atctcgacgg tcaaggacct gctgccgctg ctggagaagg tcatccagtc 540
 cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaagccctgt cgaccctggt 600 ggtc
 604 <210> 50 <211> 604 <212> DNA <213> Mycobacterium farcinogenes <400>

50 ggaggacccg tacgagaaga tcggcgctga gctcgtcaaa gaggtcgcca agaagaccga 60
 cgacgtcgcg ggcgacggca ccaccaccgc caccgttctg gccaggccc tggttcgca 120
 aggtctgcgc aacgtcgctg ccggcgccaa cccgctcggc ctgaagcgcg gcatcgagaa 180
 ggccgtcgag aaggtcaccg agacgtgct caagagcgcc aaggaggtgg agaccaagga 240
 gcagatcgct gccaccgccg gtatctccgc cggtgaccag tccatcggtg acctgatcgc 300
 cgaggccatg gacaaggtcg gcaacgaggg tgtcatcacc gtcgaggaga gcaacacctt 360
 cggcctgcag ctggagctca ccgagggtat gcgcttcgac aagggttaca tctcgggtta 420
 ctctgtgacc gacgccgagc gtcaggaagc cgtcctggag gatccctaca tcctgtgtgt 480
 cagctccaag gtctcgaccg tcaaggatct gctgccgctg ctggagaagg tcatccagtc 540
 cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaagccctgt ccaccctggt 600 ggtc
 604 <210> 51 <211> 604 <212> DNA <213> Tsukamurella paurometabola <400>

51 cgaggatccc tacgagaaga tcggcgccga gctcgtcaag gaggtcgcca agaagaccga 60

cgacgtcgcg ggcgacggca ccaccaccgc caccgttctg gccaggcgcg tcgtgcgcgga 120
 gggctctgcgc aacgtggctg cgggtgcgaa cccgctgggc ctcaagcggg gcatcgagaa 180
 ggccgtcgag gccgtgaccg agcacctgct caaggaggcc aaggaggtcg agaccaagga 240
 gcagatcgct gctaccgcgg gcatctcggc cggcgacccc gccatcggtg agtcatcgcg 300
 cgaggccatg gacaaggtcg gcaaggaagg cgtcatcacc gtcgaggaga gcaacacctt 360
 cggctctccag ctggagctca ccgagggcat gcgcttcgac aagggttca tctccggcta 420
 cttcgccacc gacgccgagc gtcaggaggc cgtgctcgag gacgcctaca tctgctcgt 480
 gtcgagcaag atctcgaccg tgaaggacct gctgccgctg ctggagaagg tcatccagtc 540
 gggcaagccg ctcgcgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaggccctgt cgacgtcat 600 cgtc

604 <210> 52 <211> 604 <212> DNA <213> Tsukamurella tyrosinosolvens

<400> 52 cgaggatccc tacgagaaga tcggcgccga gctcgtcaag gaggtcgcca agaagaccga

60 cgacgtcgcg ggcgacggca ccaccaccgc caccgttctg gccaggcgcg tcgtgcgcgga 120
 gggcctgcgc aacgtggccg cgggcgcgaa cccgctgggc ctcaagcggg gcatcgagaa 180
 ggccgtcgag gccgtctccg agcacctgct gaaggccgcc aaggaggtcg agaccaagga 240
 gcagatcgct gctaccgcgg gcatctcggc cggcgacccc gccatcggtg agtcatcgcg 300
 cgaggccatg gacaaggtcg gcaaggaagg cgtcatcacc gtcgaggaga gcaacacctt 360
 cggcctccag ctggagctca ccgagggcat gcgcttcgac aagggttca tctcgggcta 420
 cttcgccacc gacgccgagc gtcaggaggc cgtgctcgag gacgcctacg tgctgctcgt 480
 cgccggcaag atctcgaccg tcaaggacct gctgccgctg ctggagaagg tcatccagtc 540
 gggcaagccg ctcgcgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaggccctgt cgacgtcat 600 cgtc

604 <210> 53 <211> 604 <212> DNA <213> Tsukamurella pulmonis <400>

53 cgaggatccc tacgagaaga tcggcgccga gctcgtcaag gaggtcgcca agaagaccga 60
 cgacgtcgcg ggcgacggca ccaccaccgc caccgttctg gccagggcg tcgtgcgcga 120
 gggctctgcg aacgtggccg cgggcgcgaa cccgtgggc ctcaagcggg gcatcgagaa 180
 ggcggtcgac gccgtcaccg agcacctgct gaaggccgcc aaggaggtcg agaccaagga 240
 gcagatcgct gctaccgcgg gcatctcggc cggcgacccc gccatcggtg agctcatcgc 300
 cgaggccatg gacaaggtcg gcgaggaagg cgtcatcacc gtcgaggaga gcaacacctt 360
 cggctctccag ctggagctga ccgagggcat gcgcttcgac aagggttca tctcgggcta 420
 cttcgccacc gacgcggagc gccagggagg cgtcctcgag gacgcctacg tgctgctcgt 480
 ctcgggcaag atctcgaccg tcaaggacct gctgccgctg ctggagaagg tcatccagtc 540
 gggcaagccg ctgcgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaggccctgt cgacgtcat 600 cgtc
 604 <210> 54 <211> 604 <212> DNA <213> Nocardia carnea <400> 54

cgaggatccc tacgagaaga tcggcgccga gctcgtcaag gaagtcgcca agaagaccga 60
 cgacgtcgcg ggcgacggca ccaccaccgc caccgtgctc gccagggcg tggtgcgcga 120
 gggctctgcg aacgtggccg cgggcgcgaa cccgtgggc ctcaagcgca gcatcgagaa 180
 ggcggtcgag gccgtgaccg ccaagctgct cgacaccgcc aaggaggtcg agaccaagga 240
 gcagatcgcc gccaccgcgg gcatctccgc gggcgacgcg tccatcggtg agctgatcgc 300
 cgaggccatg gacaaggtcg gcaaggaagg cgtcatcacc gtcgaggaga gcaacacctt 360
 cggcctccag ctggagctga ccgagggcat gcgcttcgac aagggttaca tctcgggcta 420
 cttcgtgacc gatcccgagc gtcaggaagc ggtcctcgag gatccctaca tctgctcgt 480
 cggctcgaag gtctccaccg tcaaggacct gctgccgctg ctggagaagg tcatccaggc 540
 cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaggccctgt cgaccctggt 600 cgtg

604 <210> 55 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

HSPF3 <400> 55 atcgccaagg agatcgagct

20 <210> 56 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

HSPR3 <400> 56 aaggtgccgc ggatcttggt

20